

ÉVERSON MIGUEL BIANCO

QUÍMICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E  
CAULES DE *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr.,  
CAESALPINIACEAE

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção de grau de Mestre ao Programa de  
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Setor de Ciências da Saúde. Universidade  
Federal do Paraná.

**Orientador:** Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos.

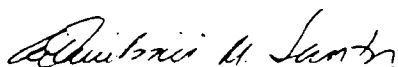
CURITIBA  
2003

## PARECER

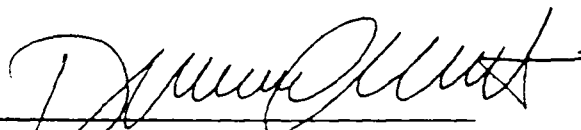
A Comissão Examinadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para julgar e avaliar a dissertação de mestrado "QUÍMICA E PONTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLHAS E CAULES *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR., CAESALPINACEAE", de autoria do pós-graduando ÉVERSON MIGUEL BIANCO, composta pelos Professores: Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos (Orientador/Presidente), Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez (Universidade Estadual de Maringá - UEM) e Dr. Brás Heleno de Oliveira (Universidade Federal do Paraná - UFPR).

A Comissão Examinadora aprova a dissertação com nota 10.0, conceito A e recomenda sua publicação após as correções sugeridas, que serão conferidas pelo orientador.

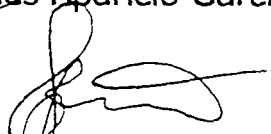
Curitiba, 30 de maio de 2003.



Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos



Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

## APRESENTAÇÃO DO ALUNO

Bacharel em Química Industrial (1998) e Especialista em Didática do Ensino Superior (1999) pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná onde iniciou suas atividades de pesquisa na linha de Química de Produtos Naturais tendo sido bolsista de Iniciação Científica PIBIC-CNPq (1996-1997). Logo que se formou, atuou como Químico Industrial na Corn Products do Brasil (1999). Mais interessado pela Pesquisa e Educação, deixou a área técnica industrial. Foi professor da rede Estadual de Ensino do Estado Paraná, tendo lecionado química para o Ensino Médio no Colégio Estadual Sagrada Família (1996-1997), Colégio Estadual Djalma Marinho (1999) e Colégio Estadual Domingos Cavalli (1999-2000). Foi professor do Colégio Bom Jesus da Aldeia em Campo Largo, PR onde lecionou a disciplina Projetos de Pesquisa para o Ensino Fundamental (2001). Atualmente, é professor de química do Colégio Positivo (Portal Educacional) em Curitiba e em 2001 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal do Paraná, sob orientação do prof. Cid Aimbiré de Moraes Santos onde continuou suas atividades de pesquisa na linha de Química de Produtos Naturais cujos resultados encontram-se nesta dissertação.

## DEDICATÓRIA

*Aos amigos Rita e Cid*

*Um, por um dia ter apresentado-me ao fascinante  
mundo da química de produtos naturais.*

*Outro, por um dia ter aberto as portas de seu laboratório  
e ter dado-me a oportunidade deste trabalho.*

*Dedico esta dissertação.*

## AGRADECIMENTOS

**PROF. TIT. CID AIMBIRÉ DE MORAES SANTOS**  
DEPTO FARMÁCIA, LAB. FARMACOGNOSIA, UFPR  
ORIENTAÇÃO

**PROF<sup>A</sup> DR<sup>A</sup> SANDRA M. WORANOVICZ BARREIRA**  
DEPTO FARMÁCIA, LAB. SÍNTESE DE MEDICAMENTOS, UFPR  
ESTUDO DE CARBOIDRATOS

**PROF<sup>A</sup> DR<sup>A</sup> CYNTHIA M. T. FADEL-PICHETH**  
DEPTO PATOLOGIA MÉDICA, LAB. MICROBIOLOGIA, UFPR  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

**PROF. DR. ANTONIO GILBERTO FERREIRA**  
**TEC. MSc. LUCIANA VISOTTO**  
DEPTO QUÍMICA, LAB. RMN, UFSCar  
ANÁLISES DE <sup>1</sup>H RMN

**DR. GERDT GUENTHER HATSCHBACH**  
MUSEU BOTÂNICO DE CURITIBA  
IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

**CLAUDENIZE PONTES DA SILVA LEAL**  
DEPTO QUÍMICA, LAB. PN E IV, UFPR  
ANÁLISES DE IV

**LAURO MERA DE SOUZA**  
DEPTO BIOQUÍMICA, LAB. CG-EM, UFPR  
ANÁLISES DE CG-EM

## EPÍGRAFE

*"Plantas sintetizam centenas de substâncias químicas. Algumas delas, podem ser mais importantes que uma galáxia inteira".*

*Prof. Otto Richard Gottlieb*

## LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

$\delta$	<i>delta</i>
$\lambda$	<i>lâmbda</i>
[ ]	<i>concentração</i>
~	<i>aproximadamente</i>
AAR%	<i>atividade antioxidante relativa</i>
Abs	<i>absorbância</i>
Ac	<i>acetil</i>
Ac <sub>2</sub> O	<i>anidrido acético</i>
AcO <sup>-</sup>	<i>acetato</i>
AcOEt	<i>acetato de etila</i>
AcOH	<i>ácido acético</i>
AlCl <sub>3</sub>	<i>cloreto de alumínio</i>
Ara	<i>arabinose</i>
BaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	<i>cloreto de bário diidratado</i>
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	<i>n-hexano</i>
CCD	<i>cromatografia em camada delgada</i>
(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O	<i>éter etílico</i>
CDCl <sub>3</sub>	<i>colofórmio deuterado</i>
CG-EM	<i>cromatografia gasosa acoplada em detector massa</i>
CHCl <sub>3</sub>	<i>clorofórmio</i>
CC	<i>cromatografia líquida em coluna preparativa</i>
comp.	<i>comprimento</i>
COSY	<i>correleated spectroscopy</i>
Cu <sup>++</sup>	<i>íon cúprico</i>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	<i>sulfato de cobre pentaidratado</i>
DCM	<i>diclorometano</i>
DEPTO	<i>departamento</i>
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	<i>dimetil sulfóxido deuterado</i>
DPPH	<i>1,1-difenil-2-picrilhidrazil</i>

<i>EBEC</i>	<i>extrato bruto etanólico dos caules</i>
<i>EBEF</i>	<i>extrato bruto etanólico das folhas</i>
<i>ECC</i>	<i>extrato clorofórmico dos caules</i>
<i>ECF</i>	<i>extrato clorofórmico das folhas</i>
<i>EEC</i>	<i>extrato etanólico deslipidificado dos caules</i>
<i>EEF</i>	<i>extrato etanólico desclorofilado das folhas</i>
<i>EHC</i>	<i>extrato n-hexaânico das folhas</i>
<i>EHF</i>	<i>extrato n-hexânico das folhas</i>
<i>EM</i>	<i>espectro de massa</i>
<i>E°red</i>	<i>potencial de redução</i>
<i>EPAl<sub>15%</sub></i>	<i>extrato polissacarídio alcalino (sol. KOH 15%)</i>
<i>EPAl<sub>2%</sub></i>	<i>extrato polissacarídio alcalino (sol. KOH 2%)</i>
<i>EPAl<sub>5%</sub></i>	<i>extrato polissacarídio alcalino (sol. KOH 5%)</i>
<i>EPA<sub>q</sub></i>	<i>extrato polissacarídio aquoso</i>
<i>FPA<sub>q</sub>S</i>	<i>fração polissacarídica aquosa sobrenadante</i>
<i>FPA<sub>q</sub>P</i>	<i>fração polissacarídica aquosa precipitado</i>
<i>FPAl<sub>2%</sub>S</i>	<i>fração polissacarídica alcalina 2% sobrenadante</i>
<i>FPAl<sub>2%</sub>P</i>	<i>fração polissacarídica alcalina 2% precipitado</i>
<i>FPAl<sub>5%</sub>S</i>	<i>fração polissacarídica alcalina 5% sobrenadante</i>
<i>FPAl<sub>5%</sub>P</i>	<i>fração polissacarídica alcalina 5% precipitado</i>
<i>FPAl<sub>15%</sub>S</i>	<i>fração polissacarídica alcalina 15% sobrenadante</i>
<i>FPAl<sub>15%</sub>P</i>	<i>fração polissacarídica alcalina 15% precipitado</i>
<i>ERO</i>	<i>espécies reativas de oxigênio</i>
<i>EtOH</i>	<i>etanol</i>
<i>EtOH/H<sub>2</sub>O</i>	<i>hidroetanólico</i>
<i>f.m</i>	<i>fase móvel</i>
<i>FAEC</i>	<i>fração acetato de etila dos caules</i>
<i>FAEF</i>	<i>fração acetato de etila das folhas</i>
<i>FA<sub>q</sub>C</i>	<i>fração aquosa dos caules</i>
<i>FA<sub>q</sub>F</i>	<i>fração aquosa das folhas</i>
<i>FDCMC</i>	<i>fração diclorometano dos caules</i>
<i>FDCMF</i>	<i>fração diclorometano das folhas</i>
<i>Fe<sup>++</sup></i>	<i>ion ferroso</i>
<i>FeCl<sub>3</sub></i>	<i>cloreto férrico</i>



<i>FTC</i>	<i>fração tanínica dos caules</i>
<i>FTF</i>	<i>fração tanínica das folhas</i>
<i>Fuc</i>	<i>fucose</i>
<i>Gal</i>	<i>galactose</i>
<i>Glu</i>	<i>glucose</i>
$H_2CO_2$	<i>ácido fórmico</i>
$H_2O$	<i>água</i>
$H_2O_2$	<i>peróxido de oxigênio</i>
$H_2SO_4$	<i>ácido sulfúrico</i>
<i>HCl</i>	<i>ácido clorídrico</i>
<i>HMBC</i>	<i>Hetcor Long-range</i>
<i>HMQC</i>	<i>Hetcor (<math>^1H</math>-<math>^{13}C</math> Cosy)</i>
<i>HO</i>	<i>radical hidroxil</i>
<i>IC</i>	<i>concentração inibitória</i>
<i>IC<sub>50</sub></i>	<i>concentração inibitória média</i>
<i>IV</i>	<i>infravermelho</i>
<i>J</i>	<i>constante de acoplamento</i>
<i>KOH</i>	<i>hidróxido de potássio</i>
<i>LAB</i>	<i>laboratório</i>
<i>larg.</i>	<i>largura</i>
<i>m/z</i>	<i>relação massa-carga</i>
$M^+$	<i>íon molecular</i>
<i>Man</i>	<i>manose</i>
<i>MBC</i>	<i>Museu Botânico de Curitiba</i>
$Me^{++}$	<i>íon metálico</i>
$Me_2CO$	<i>acetona</i>
<i>MeOH</i>	<i>metanol</i>
<i>min.</i>	<i>minutos</i>
$Na_3PO_4$	<i>fosfato de sódio tribásico</i>
$NaBH_4$	<i>boroidreto de sódio</i>
$NaCl$	<i>cloreto de sódio</i>
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	<i>molibdato de amônio</i>
<i>NO</i>	<i>óxido nítrico</i>
<i>Np/PEG</i>	<i>2-aminoetil-difenil-borinato/polietilenoglicol 4.000</i>

<i>ONOO<sup>-</sup></i>	<i>peroxinitrito</i>
<i>p.f.</i>	<i>ponto de fusão</i>
<i>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></i>	<i>pentóxido de fósforo</i>
<i>Pb(AcO)<sub>2</sub></i>	<i>acetato de chumbo</i>
<i>PbO<sub>2</sub></i>	<i>óxido de chumbo</i>
<i>PN</i>	<i>produtos naturais</i>
<i>RMN <sup>1</sup>H</i>	<i>ressonância magnética nuclear de próton</i>
<i>RMN <sup>13</sup>C</i>	<i>ressonância magnética nuclear de carbono 13</i>
<i>ppt</i>	<i>precipitação, precipitado</i>
<i>r.p.m</i>	<i>rotação por minuto</i>
<i>Ram</i>	<i>ramnose</i>
<i>Rib</i>	<i>ribose</i>
<i>RO<sup>•</sup></i>	<i>radical alcóxil</i>
<i>ROO<sup>•</sup></i>	<i>radical peróxil</i>
<i>sol.</i>	<i>solução</i>
<i>T.A</i>	<i>temperatura ambiente</i>
<i>TBA</i>	<i>ácido tiobarbitúrico</i>
<i>TEC</i>	<i>técnico</i>
<i>TFA</i>	<i>ácido trifluoroacético</i>
<i>T<sub>R</sub></i>	<i>tempo de retenção</i>
<i>UFPR</i>	<i>Universidade Federal do Paraná</i>
<i>Un.</i>	<i>unidade</i>
<i>UV</i>	<i>ultravioleta</i>
<i>Xil</i>	<i>xilose</i>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Preço (US\$) de metabólitos secundários vegetais com aplicação na saúde humana.....	4
<b>Tabela 2.</b> Constituintes químicos isolados e identificados de espécies do gênero Bauhinia.....	11
<b>Tabela 3.</b> Estrutura de flavonóides.....	20
<b>Tabela 4.</b> Alguns exemplos de radicais livres.....	30
<b>Tabela 5.</b> Classes químicas encontradas em folhas e caules de <i>B. microstachya</i> .....	36
<b>Tabela 6.</b> Rendimentos dos extratos obtidos a partir dos Esquemas 6 e 7.....	40
<b>Tabela 7.</b> Rendimentos dos extratos obtidos a partir do Esquema 8.....	40
<b>Tabela 8.</b> Valores e AAR% <sub>(ác. ascórbico)</sub> para FAEF e FAEC em diferentes concentrações.....	45
<b>Tabela 9.</b> Valores e AAR% <sub>(quercetina)</sub> para FAEF e FAEC em diferentes concentrações.....	46
<b>Tabela 10.</b> Determinação da IC <sub>50</sub> de padrões antioxidantes e das frações FAEF e FAEC.....	51
<b>Tabela 11.</b> Determinação da IC <sub>50</sub> de BM3 e BM4.....	64
<b>Tabela 12.</b> Porcentagem relativa de monossacarídeos nos extratos de folhas de <i>B. microstachya</i> .....	76
<b>Tabela 13.</b> Identificação de monossacarídeos por espectrometria de massa a partir da fragmentação de acetatos de alditóis.....	81
<b>Tabela 14.</b> Rendimento das frações obtidas a partir do fracionamento congelamento e degelo.....	83
<b>Tabela 15.</b> Proporção monossacarídica das frações obtidas a partir do fracionamento congelamento e degelo.....	83
<b>Tabela 16.</b> Extratos obtidos de folhas de <i>B. microstachya</i> visando a identificação de metabólitos primários.....	86
<b>Tabela 17.</b> Extratos obtidos de folhas de <i>B. microstachya</i> visando a identificação de metabólitos secundários e atividade antioxidante.....	86
<b>Tabela 18.</b> Frações obtidas a partir da purificação congelamento e degelo dos extratos EPA <sub>q</sub> , EPAI <sub>2%</sub> , EPAI <sub>5%</sub> e EPAI <sub>15%</sub> .....	92



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspectos botânicos (I) de <i>B. microstachya</i> (Raddi) Macbr. Inflorescência, caule ramo e folhas.....	08
<b>Figura 2.</b> Aspectos botânicos (II) de <i>B. microstachya</i> (Raddi) Macbr. Ramo, cálice e androceu, pétala, gineceu e legume.....	09
<b>Figura 3.</b> Variação folhar em indivíduos de floresta ombrófila. Locais abertos e locais fechados.....	10
<b>Figura 4.</b> Arbusto escandente, variação folhar em indivíduos de locais abertos e secos e úmido ou sombrios.....	10
<b>Figura 5.</b> Esqueleto básico de um flavonóide.....	20
<b>Figura 6.</b> Flavonóides como quelantes de íons metálicos bivalentes.....	23
<b>Figura 7.</b> Estruturas de determinantes antigênicos dos grupos sanguíneos A, B e O.....	27
<b>Figura 8.</b> Representação de orbitais mais externos de uma espécie química radicalar e não radicalar.....	30
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica do Estado do Paraná e regiões de coleta da espécie.....	36
<b>Figura 10.</b> Coloração das sol. após redução do complexo fosfomolibdênico.....	42
<b>Figura 11.</b> Representação gráfica da AAR% de extratos de <i>B. microstachya</i> tendo como base a atividade do ác. ascórbico.....	44
<b>Figura 12.</b> Representação gráfica da AAR% de extratos de <i>B. microstachya</i> tendo como base a atividade da quercetina.....	44
<b>Figura 13.</b> Representação gráfica da AAR% das frações FAEF e FAEC tendo como base atividade do ác. ascórbico.....	45
<b>Figura 14.</b> Representação gráfica da AAR% das frações FAEF e FAEC tendo como base atividade da quercetina.....	46
<b>Figura 15.</b> Representação gráfica da AAR% das frações FTF e FTC tendo como base atividade da quercetina.....	47
<b>Figura 16.</b> Representação gráfica do aumento da atividade antioxidante da fração FAEF em relação ao padrão quercetina.....	48
<b>Figura 17.</b> Representação de amostras mais diluídas (violetas) e mais concentradas (amarelas) em sol. de DPPH.....	49
<b>Figura 18.</b> Representação gráfica dos valores da IC <sub>50</sub> x [ ] µg/ml da rutina.....	50

<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400MHz, DMSO- $d_6$ ) de BM2.....	54
<b>Figura 20.</b> Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400MHz, DMSO- $d_6$ ) de BM2.....	55
<b>Figura 21.</b> Espectro de COSY (400MHz, DMSO- $d_6$ ) de BM2.....	56
<b>Figura 22.</b> Espectro de COSY (400MHz, DMSO- $d_6$ ) da porção aglicona de BM2.....	58
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400MHz, DMSO- $d_6$ ) de BM3.....	60
<b>Figura 24.</b> Espectro de COSY (400MHz, DMSO- $d_6$ ) de BM3.....	61
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400MHz, DMSO- $d_6$ ) de BM4.....	63
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (200MHz, DMSO- $d_6$ ) de BM5.....	65
<b>Figura 27.</b> Cromatograma (CG) e espectro de massa de BM5.....	66
<b>Figura 28.</b> CCD da quercetina, rutina e BM4 reveladas com DPPH.....	70
<b>Figura 29.</b> Modelo antibiograma (difusão em ágar) utilizando a fração FAEF em diferentes concentrações frente ao <i>S. aureus</i> .....	72
<b>Figura 30 .</b> Modelo antibiograma (diluição em ágar) utilizando o extrato EBEF na concentração de 5.000µg/ml frente ao <i>S. aureus</i> .....	72
<b>Figura 31.</b> Cromatogramas de acetatos de alditóis obtidos a partir de padrões monossacarídicos, EPA <sub>q</sub> e EPA <sub>l2%</sub> .....	77
<b>Figura 32.</b> Cromatogramas de acetatos de alditóis obtidos a partir de padrões monossacarídicos, EPA <sub>l3%</sub> e EPA <sub>l15%</sub> .....	78
<b>Figura 33.</b> Espectro de massa de acetato de alditol de ramnose, fucose e ribose.....	79
<b>Figura 34.</b> Espectro de massa de acetato de alditol de arabinose, xilose e manose.....	80
<b>Figura 35.</b> Espectro de massa de acetato de alditol de galactose e glucose.....	81

## LISTA DE ESQUEMAS

<i>Esquema 1. Flavonóides como terminadores de reações de cadeia.....</i>	<b>24</b>
<i>Esquema 2. Biossíntese de flavonóides.....</i>	<b>25</b>
<i>Esquema 3. Representação dos primeiros açúcares formados na fotossíntese.....</i>	<b>26</b>
<i>Esquema 4. Fases de uma reação em cadeia (iniciação, propagação e terminação).....</i>	<b>31</b>
<i>Esquema 5. Reação de Fenton.....</i>	<b>31</b>
<i>Esquema 6. Obtenção dos extratos (metabolismo secundário) a partir de 1kg de folhas de B. microstachya.....</i>	<b>37</b>
<i>Esquema 7. Obtenção dos extratos (metabolismo secundário) a partir de 1kg de caules de B. microstachya.....</i>	<b>38</b>
<i>Esquema 8. Obtenção dos extratos (metabolismo primário) a partir de 95g de folhas de B. microstachya.....</i>	<b>39</b>
<i>Esquema 9. Reação de obtenção de DPPH através da difenilpicrilhidrazina.....</i>	<b>49</b>
<i>Esquema 10. Compostos fenólicos e o mecanismo antioxidante.....</i>	<b>69</b>
<i>Esquema 11. Etapas para a identificação dos monossacarídeos das folhas de B. microstachya.....</i>	<b>73</b>





## RESUMO

O gênero *Bauhinia*, Caesalpiniaceae, é composto por 250 espécies distribuídas na América, África, Ásia e Oceania. No Brasil, plantas desse gênero são conhecidas popularmente por pata-de-vaca, cuja principal atividade a elas atribuídas é a hipoglicemiante. Das espécies brasileiras, apenas cinco delas são trepadeiras sendo a *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., conhecida popularmente por escada-de-macaco ou cipó-escada, uma delas. Nesse estudo, pela primeira vez é relatado a atividade antioxidante desta espécie de *Bauhinia*.

Os extratos brutos etanólicos de folhas e caules de *B. microstachya* e frações obtidas em acetado de etila através da partição desses extratos apresentaram alta atividade antioxidante relativa quando comparados com padrões de ácido ascórbico e quercetina pela metodologia da redução do complexo fosfomolibdênico.

As frações acetato de etila das folhas e caules, quando submetidas a reação de redução do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foram mais ativas que padrões antioxidantes de ácido ascórbico e rutina. Dessas frações, seis substâncias foram isoladas e designadas por BM1, BM2, BM4, BM5, BM6 e BM7 e uma fração constituída de pelo menos quatro substâncias foi chamada de BM3. As substâncias BM2, BM4 e BM5 foram identificadas como sendo o flavonóide vitexina (8-C-glucosil-apigenina), o benzenóide galato de metila e o hidrocarboneto hexatriacontano, respectivamente, a partir de dados espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H. A fração BM3 e a substância BM4 quando submetidas a reação de redução do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) em CCD, apresentaram-se ativas como antioxidantes quando comparados com as substâncias padrões.

Os monossacarídeos ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose, extraídos das folhas de *B. microstachya* foram identificados por CG-EM.

**Palavras-chave:** *Bauhinia microstachya*, escada-de-macaco, flavonóides, antioxidantes, vitexina, hexatriacontano.



## ABSTRACT

The *Bauhinia* genus, Caesalpinaceae, is composed by 250 species distributed in America, Africa, Asia and Oceania. In Brazil, species from this genus are popularly known as "pata-de-vaca" and used because of their hypoglycaemic properties. *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., is one of the five woody creeper species popularly known in several regions of Brazil as "escada-de-macaco" or "cipó-escada". This study is the first to report of its antioxidant activity.

Crude ethanolic extracts from leaves and stems of *B. microstachya* as well as its ethyl acetate fractions obtained from partitioning the crude extract, presented high antioxidant activity when compared with ascorbic acid and quercetin used as controls, using the phosphomolibdenum complex methodology.

The ethyl acetate fractions from its leaves and stems, when tested by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) reduction reaction, were more active than ascorbic acid and rutin. Six compounds were isolated from these fractions, named as BM1, BM2, BM4, BM5, BM6 e BM7. The fraction BM3 showed to have at least four compounds. BM2, BM4 and BM5 were identified by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy as the flavonoid vitexin (8-C-glucosyl-apigenin), methyl gallate and the hydrocarbon hexatriacontane, respectively. The BM3 and BM4 fraction, when submitted to DPPH reaction in TLC have shown antioxidant activity when compared with the standard substances.

The Monosaccharides such as rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, manose, galactose and, glucose were extracted from the leaves of *B. microstachya* and identified by GC-MS.

**Keywords:** *Bauhinia microstachya*, escada-de-macaco, flavonoids, antioxidants, vitexin, hexatriacontane.



# SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DO ALUNO.....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
EPÍGRAFE.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUÇÃO.....	01
<i>Química de produtos naturais: um breve histórico</i> .....	01
<i>Aspectos botânicos de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbr.</i> .....	06
<i>Posição taxonômica da espécie</i> .....	06
<i>Descrição botânica de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbr.</i> .....	07
<i>Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico</i> .....	11
<i>Espécies com ação hipoglicemiantes</i> .....	17
<i>Espécies com atividade microbiológica</i> .....	18
<i>Outras atividades do gênero</i> .....	18
<i>Flavonóides como antioxidantes e ocorrência natural</i> .....	20
<i>Biossíntese de flavonóides</i> .....	25
<i>Carboidratos: definição de biossíntese</i> .....	26
<i>Danos celulares, radicais livres e espécies reativas de oxigênio</i> .....	29
OBJETIVOS.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
<i>Abordagem fitoquímica</i> .....	35
<i>Rendimento dos extratos obtidos</i> .....	36
<i>Teor de flavonóides</i> .....	40
<i>Ensaio antioxidantes</i> .....	41
<i>Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico</i> .....	42
<i>Ensaio da redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)</i> .....	49
<i>Determinação da IC<sub>50</sub> da quercetina, rutina, ácido ascórbico, FAEF e FAEC</i> .....	50
<i>Cálculo da IC<sub>50</sub> rutina</i> .....	51
<i>Determinação estrutural das substâncias BM2, BM3, BM4 e BM5</i> .....	52
<i>Determinação da IC<sub>50</sub> de BM3 e BM4</i> .....	64
<i>Determinação qualitativa por CCD da atividade antioxidante de um composto isolado</i> .....	70
<i>Ensaio antimicrobiano</i> .....	71
<i>Identificação dos monossacarídeos presentes nas folhas de B. microstachya</i> .....	76
EXPERIMENTAL.....	85
<i>Coleta do material</i> .....	85
<i>Abordagem fitoquímica das folhas de Bauhinia microstachya</i> .....	85
<i>Preparação dos extratos</i> .....	85
<i>Isolamento da substância BM1</i> .....	87
<i>Isolamento da substância BM2</i> .....	87
<i>Isolamento da substância BM3</i> .....	88
<i>Isolamento da substância BM4</i> .....	88
<i>Isolamento da substância BM5</i> .....	89

<i>Isolamento das substâncias BM6 e BM7</i> .....	89
<i>Frações contendo taninos obtidas da fração FAEF</i> .....	90
<i>Precipitação, neutralização, diálise e liofilização dos extratos</i>	
<i>EPA<sub>q</sub>, EPAI<sub>2%</sub>, EPAI<sub>5%</sub> e EPAI<sub>15%</sub></i> .....	90
<i>Hidrólise ácida de EPA<sub>q</sub>, EPAI<sub>2%</sub>, EPAI<sub>5%</sub> e EPAI<sub>15%</sub></i> .....	90
<i>Redução dos monossacarídeos a alditóis</i> .....	91
<i>Acetilação</i> .....	91
<i>Análise por CG-EM</i> .....	91
<i>Fracionamento através de congelamento e degelo</i> .....	92
<i>Fracionamentos por coluna de SiO<sub>2</sub> e Sephadex® LH20</i> .....	92
<i>Doseamento de flavonóides totais</i> .....	93
<i>Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico</i> .....	94
<i>Ensaio da redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)</i> .....	94
<i>Avaliação da capacidade antioxidante de um composto isolado por CCD</i> .....	95
<i>Ensaio antimicrobiano</i> .....	95
<i>Equipamentos e reagentes utilizados</i> .....	97
<b>CONCLUSÕES</b> .....	99
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101

## Química de produtos naturais: um breve histórico

# 1

## Introdução

*Química de produtos naturais: um breve histórico*

*Aspectos botânicos da espécie*

*Revisão bibliográfica*

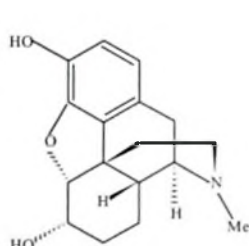
*Flavonóides como antioxidantes e ocorrência natural*

*Biossíntese de flavonóides*

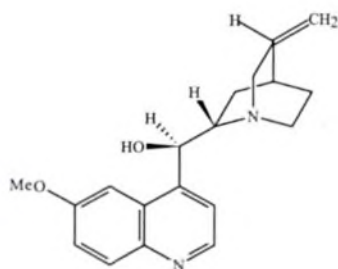
*Carboidratos: definição e biossíntese*

*Danos celulares, radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO)*

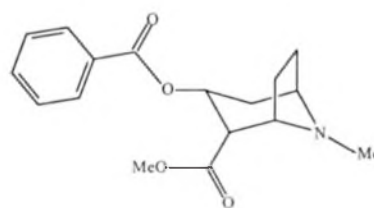
Os metabólitos secundários produzidos por plantas, melhor conceituados por Gottlieb<sup>1</sup> como metabólitos especiais, tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química medicinal. Historicamente, a química orgânica iniciou com a química de produtos naturais há mais de duzentos anos quando Bergman criou a expressão compostos orgânicos\* para designar substâncias produzidas por vegetais ou animais.<sup>2</sup> Seu real desenvolvimento ocorreu paralelamente ao estudo das plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos botânicos com embasamentos científicos, o que resultou no isolamento de diversas substâncias ativas de plantas já então conhecidas como medicinais. Muitas dessas substâncias isoladas se consagraram pela relevante atividade e, até hoje, ainda são empregadas no tratamento de certas doenças, a exemplo da morfina (I), quinina (II), cocaína (III), cânfora (IV), ergotamina (V) e ácido salicílico (VI).<sup>3</sup>



(I)

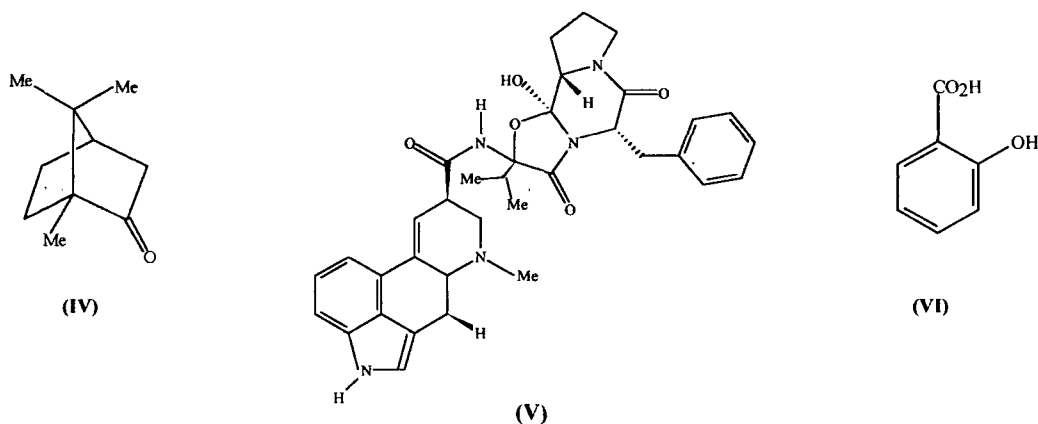


(II)



(III)

\* O termo **compostos orgânicos** foi usado pela primeira vez em 1780 por Torbern Bergman, já o termo **química orgânica**, surgiu em 1807 com Jöns Jacob Berzelius.<sup>2</sup>

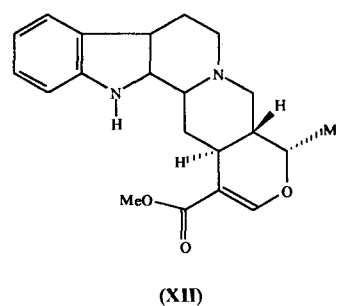
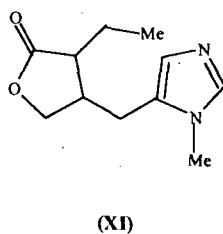
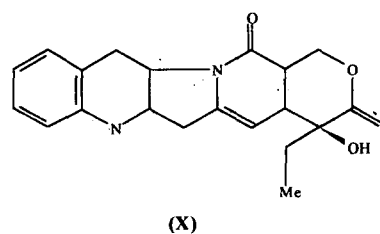
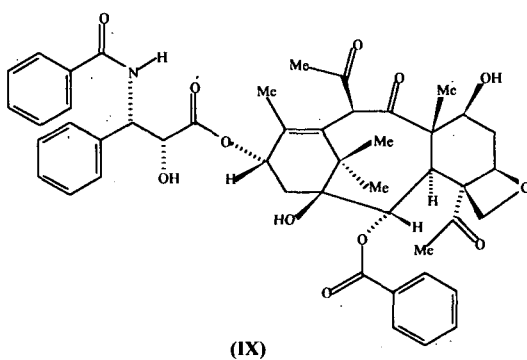
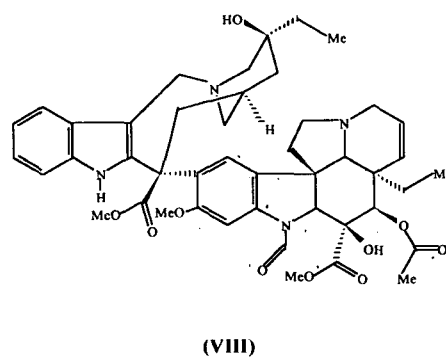
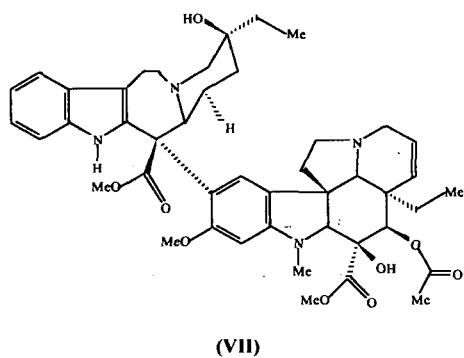


A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias conhecidas. Um levantamento realizado ainda na década de oitenta,<sup>4</sup> identificou 121 compostos oriundos de 95 espécies vegetais usados correntemente na medicina ocidental. Além disto, do total de medicamentos aprovados no período de 1983-1994, cerca 6% são de produtos naturais, 24% são derivados destes e 9% foram desenvolvidos pela indústria farmacêutica com base em produtos naturais. Segundo Verpoorte,<sup>4</sup> estima-se que aproximadamente 110.000 estruturas químicas foram identificadas até o momento, sendo os terpenóides o maior grupo (~33.000 compostos), seguido pelos alcalóides (~16.000 compostos)<sup>4</sup> e flavonóides (~4.000).<sup>5</sup> Somente na última década, um total de 3.500 compostos pela primeira vez descritos na literatura, vêm anualmente sendo descobertos com a elucidação das estruturas químicas. Segundo Abelson, citado por Verpoorte,<sup>4</sup> deste total, cerca de 3.000 compostos foram isolados a partir de espécies vegetais superiores. Essa fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismos de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microorganismos, insetos, animais e também condições de adaptação e regulação. Segundo Gottlieb,<sup>6</sup> “*animais se defendem pelo comportamento, as plantas, incapazes de fugir, se defendem pelo quimismo*”.

Estima-se que atualmente 500.000 espécies vegetais ocupam o planeta, constituindo assim, um enorme laboratório de síntese orgânica que, segundo Gottlieb, ainda se encontra praticamente desconhecido.<sup>7</sup> É importante também ressaltar que das 110.000 estruturas isoladas muito pouco se conhece a respeito de seus potenciais farmacológicos, porém, nas últimas décadas, uma mudança importante no paradigma das sociedades ocidentais fez com que os produtos naturais de origem vegetal



chamassem a atenção das indústrias farmacêuticas, que, motivadas em parte pela descoberta de quimioterápicos eficazes como a vimblastina (Velblan®) (VII), vincristina (Oncovin®) (VIII), taxol (Taxol®) (IX), camptotecina (X), pilocarpina (XI) e ajmalicina (XII), reativaram o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional.<sup>8</sup>



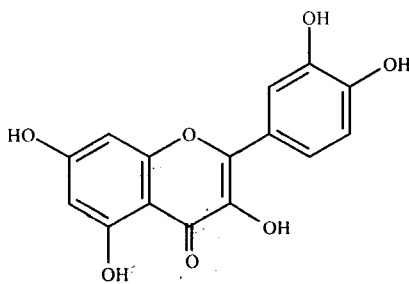
Produtos como esses, pela alta reatividade e baixos rendimentos na extração adquirem no mercado preços exorbitantes, como pode ser visto na Tabela 1.

**Tabela 1.** Preço (US\$) de metabólitos secundários vegetais com aplicação na saúde humana<sup>9</sup>

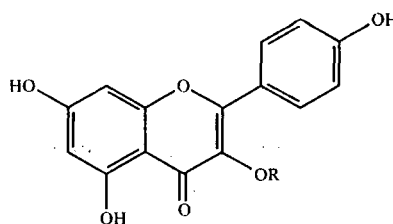
Composto	Un.	Função	US\$
<i>Vimblastina</i>	g	Antineoplásico (coriocarcinomas e doença de Hodgkin)	14.400
<i>Vincristina</i>	g	Antineoplásico (leucemia infantil)	5.700
<i>Morfina</i>	g	Analgésico	.80
<i>Chiconina</i>	g	Corante	45
<i>Digoxina</i>	g	Cardiotônico	30
<i>Ajmalicina</i>	g	Antiarrítmico	15
<i>Óleo de jasmim</i>	kg	Cosmético	5.000

Segundo Grifo e Rosenthal, dos medicamentos mais prescritos pelos médicos, 57% são provenientes de fontes naturais. Desses, 23% são de origem animal, 18% vegetal, 15% microbiológica e 1% marinha. De todos esses medicamentos, pouco menos da metade, 43%, são totalmente obtidos através de processos sintéticos ou por mudança estrutural de produtos naturais.<sup>8,10</sup>

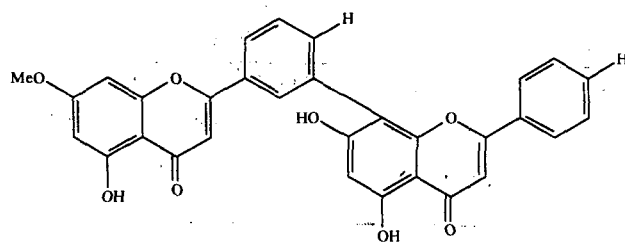
Dos medicamentos industrializados de origem natural destaca-se o Tebonin® (BYC®), produzido a partir das folhas da *Ginkgo biloba* L. usado na prevenção de incidentes vasculares, distúrbios da memória, asma alérgica, doença de Alzheimer, como antioxidante, entre outros. A atividade antioxidante das folhas da *Ginkgo biloba* deve-se a presença de componentes polifenólicos, flavonóides (quercetina (XIII) e campferol (XIV)) e biflavonóides (bilobetina (XV), ginkgetina (XVI), isoginkgetina (XVII) e sciadopitysina (XVIII)).<sup>11</sup>



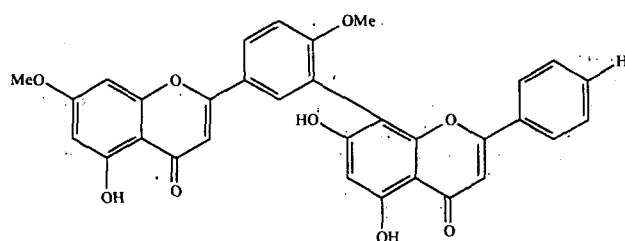
(XIII)



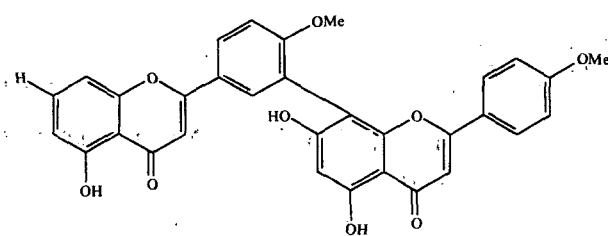
(XIV)



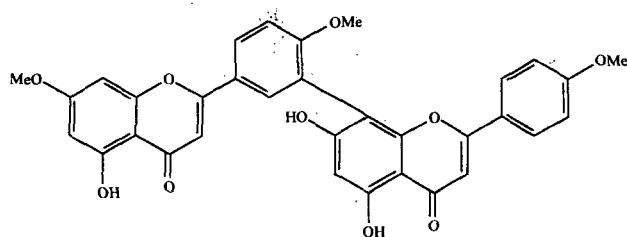
(XV)



(XVI)



(XVII)



(XVIII)

Devido a todas estas constatações, os produtos naturais e derivados, foram e continuam sendo de notória importância em determinados setores da sociedade moderna, mesmo considerando o grande número de produtos produzidos por síntese.

*Aspectos botânicos de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbr.*

*Sinônimas da espécie até presente data:*<sup>12</sup>

*Schnella microstachya* Raddi (1919);

*Bauhinia tomentosa* Velloso (1829);

*Bauhinia scandens* Velloso (1831);

*Bauhinia langsdorffiana* Bongard (1838);

*Bauhinia bahiensis* Bongard (ano desconhecido);

*Bauhinia spicata* Vogel (1839);

*Bauhinia vogeliana* Steudel (1840);

*Bauhinia langsdorffiana* Bongard var. *bahiensis* (1870);

*Bauhinia lagesiana* Harms (1907);

*Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride (1976).

*Posição taxonômica da espécie segundo Cronquist*<sup>13</sup>

<b>Divisão</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Subclasse</b>	Rosidae
<b>Ordem</b>	Fabales
<b>Família</b>	Caesalpiniaceae
<b>Gênero</b>	<i>Bauhinia</i>
<b>Espécie</b>	<i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbr.

### *Descrição botânica*

Arbusto escandente ou liana\*, folha sempre bilobada com 3-9cm comp. x 1,5-5cm larg., face inferior com tricomas apressos esparsos, cartáceas e subcoriáceas, pecíolo com 1-4cm comp., inflorescência paniculada com racemos parciais espiciformes, com indumento ferrugíneo-tomentoso, brácteas e bractéolas com 1mm comp., caducas. Botão floral globoso, liso, sem nervação aparente, sem lóbulos, flores com 7-9mm comp., cálice com 3,5-6mm comp. x 4-6mm larg., pétalas com 5-8mm comp. x 2,5-4mm larg., sub-iguais, unguiculadas, sem apêndices laterais, anteras oblongas com 2-2,5mm comp., ovário sésil ou curtamente estipado, ferrugíneo-tomentoso, estilete crasso, estigma apical dilatado, fruto indeiscente, oblongo a elítico estreito, planomembranáceo ou cartáceo e curtamente estipado, ferrugíneo, embrião transverso oblongo com 10-14mm larg., eixo hipocólico-radícula obliquo central. Os frutos são do tipo legume e medem cerca de 4-5cm comp. x 1,5-2cm larg. (Figura 1 e 2).

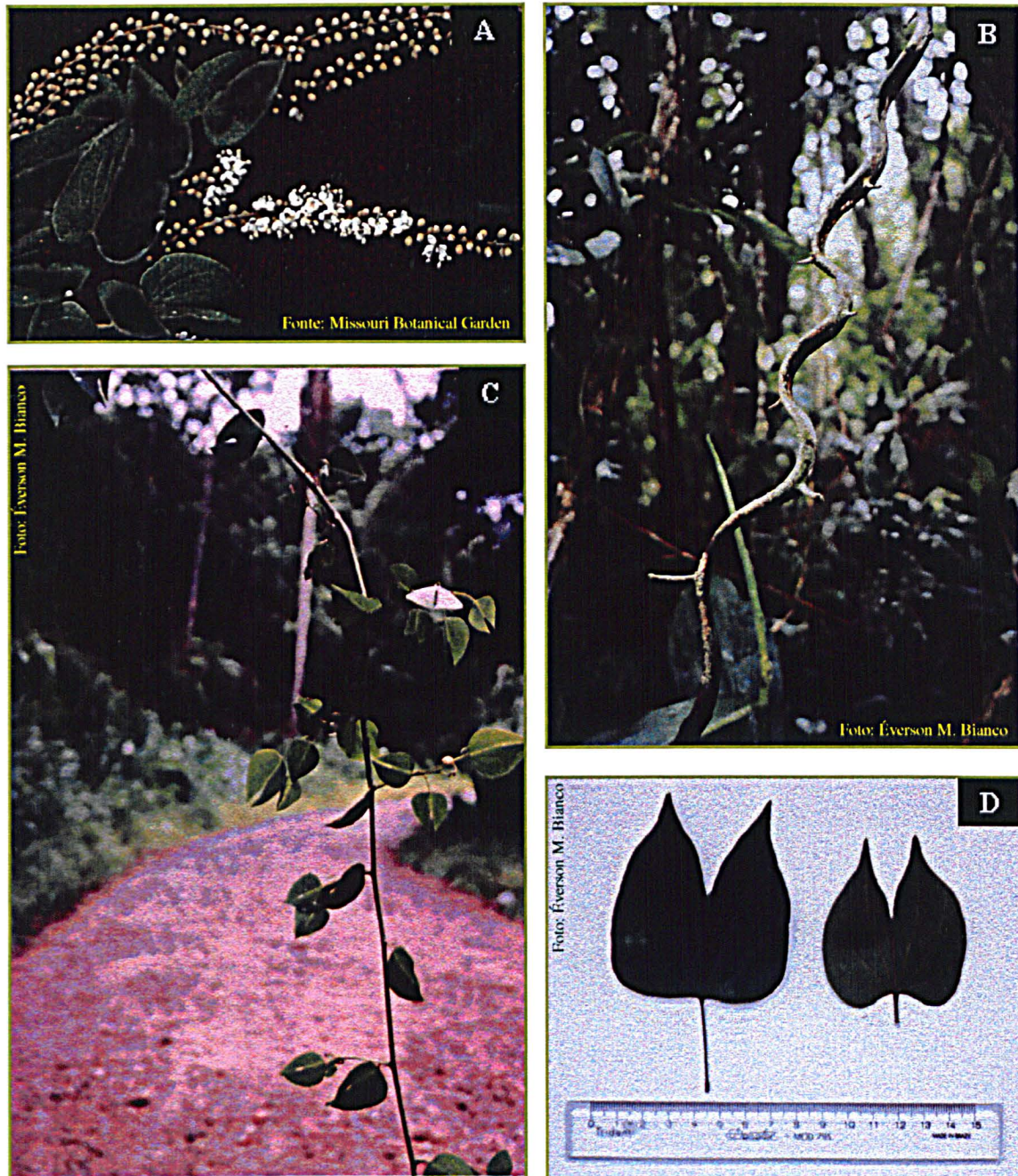
O pólen desta espécie foi estudado primeiramente por Barth e Bouzada em 1964 e posteriormente, por Ferguson e Pearce em 1986. A estrutura anômala do caule deste cipó foi demonstrada por Schenk em 1892, ainda sobre o nome de *Bauhinia langsdorffiana* Bongard var. *bahiensis*.<sup>14</sup> Possui ampla distribuição geográfica, desde a América Central, no Panamá, Guatemala e Belize, até a região norte da Argentina, passando pela Colômbia, Venezuela, Perú, Paraguai e Bolívia. No Brasil, há registros de coletas na Amazônia, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina.<sup>12</sup> No Paraná, segundo levantamento em *herbarium* (MBC e UFPR), há registros de coleta nas regiões de Morretes, Antonina, Guaraqueçaba, Guaratuba, Paranaguá, Estrada da Graciosa, Laranjeiras do Sul, Cascavel, Medianeira, São Miguel do Iguaçu e Foz do Iguaçu.

Devido o formato de seu caule (Figura 1), a espécie no Brasil é conhecida popularmente por cipó-escada ou escada-de-macaco, sendo muitas vezes confundida com outras cinco espécies trepadeiras também conhecidas por escada-de-macaco, *Bauhinia angulosa* Vogel, *Bauhinia radiata* Vell., *Bauhinia smiliciana* Steudel, *Bauhinia microstachya* var. *massambensis* Vaz e *Bauhinia splendens* H. B. K.<sup>14,15</sup>

Um caráter adicional para a identificação do gênero no campo é a presença de vestígios dos ramos laterais já definidos, em forma de projeções lenhosas pontiagudas

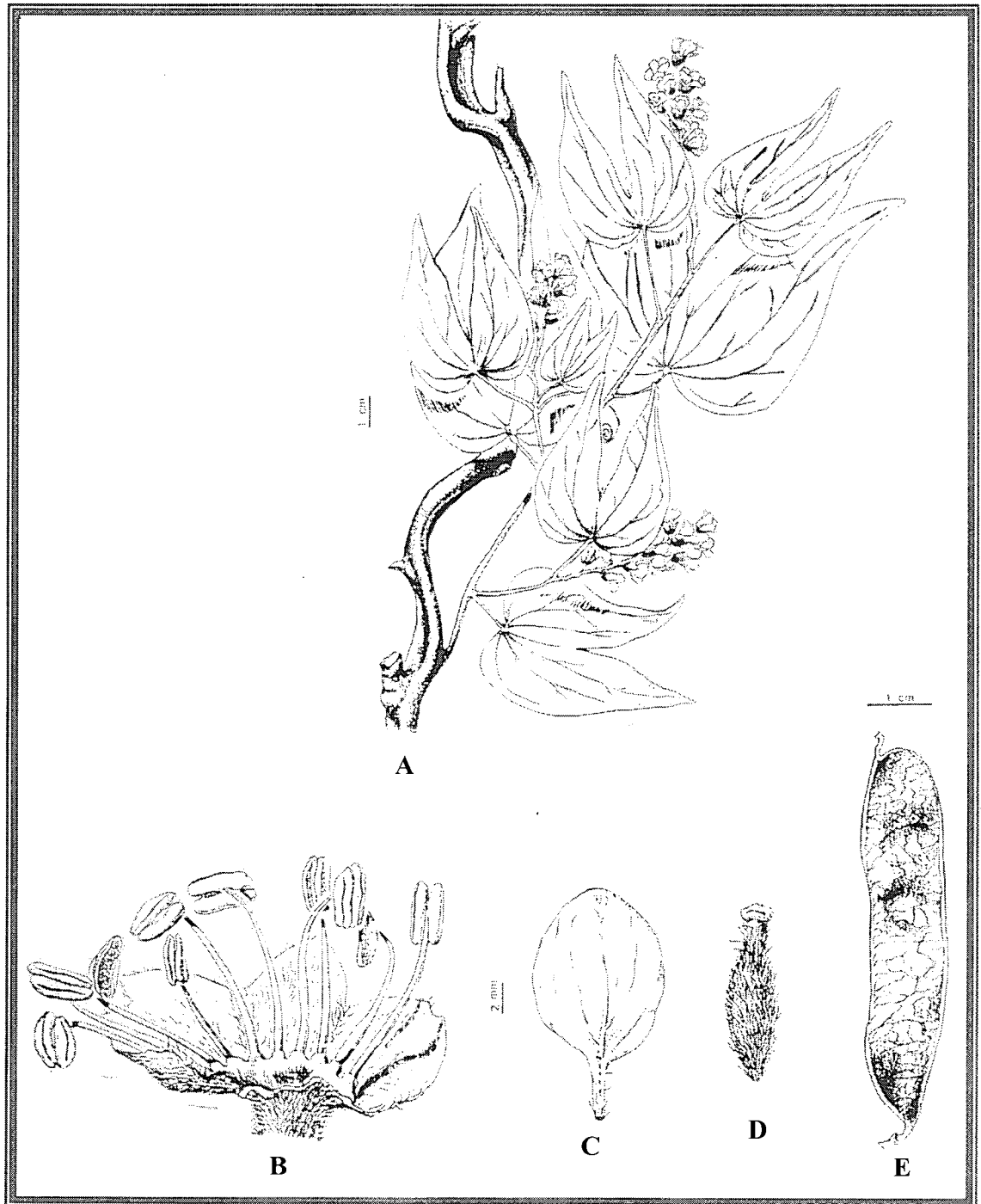
\* **Liana:** cipó lenhoso. Do francês *liane*.

lembrando espinhos (Figura 1 e 2),<sup>12</sup> em março quando floresce, suas flores branco-amareladas destacam-se entre a vegetação, facilitando também a identificação e coleta da espécie. Frutifica a partir de abril. Geralmente é encontrada em formações florestais ombrófilas e de capoeiras e suas folhas podem apresentar variações dependendo dos níveis de claridade e competição de sua vizinhança (Figura 3 e 4).<sup>14</sup> Estende-se desde o nível do mar, até 1000m de altitude.

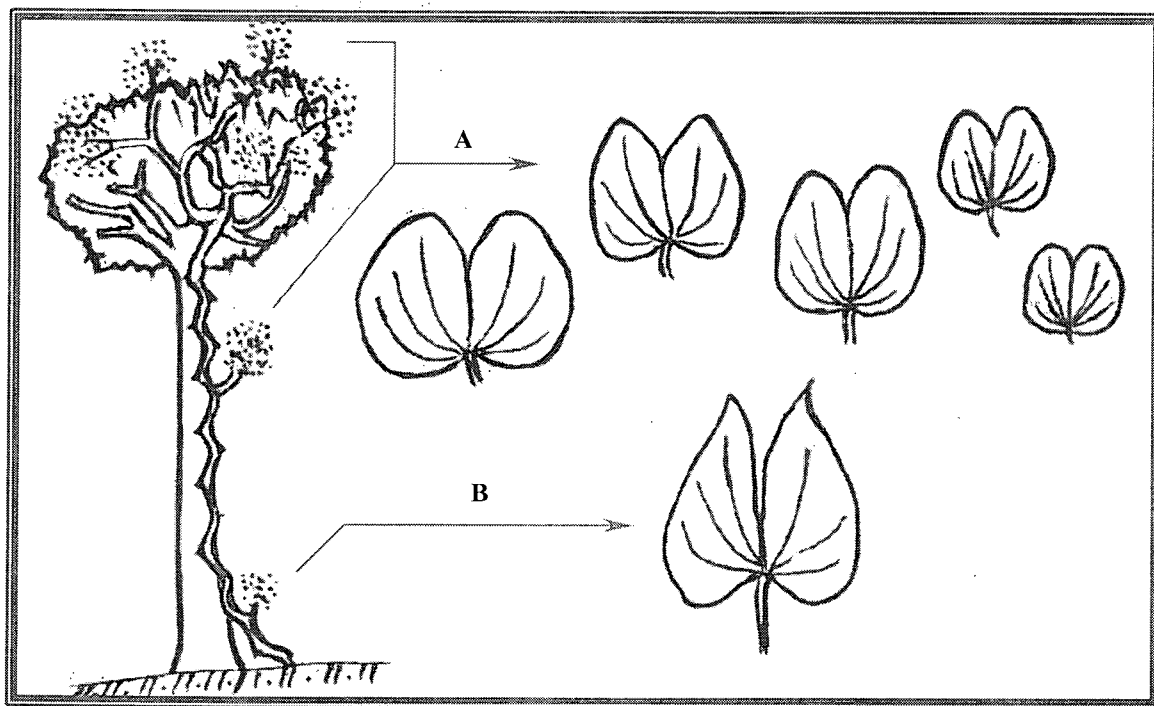


**Figura 1.** Aspectos botânicos (I) de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. Inflorescência (A); caule (B); ramo (C) e folhas (D).

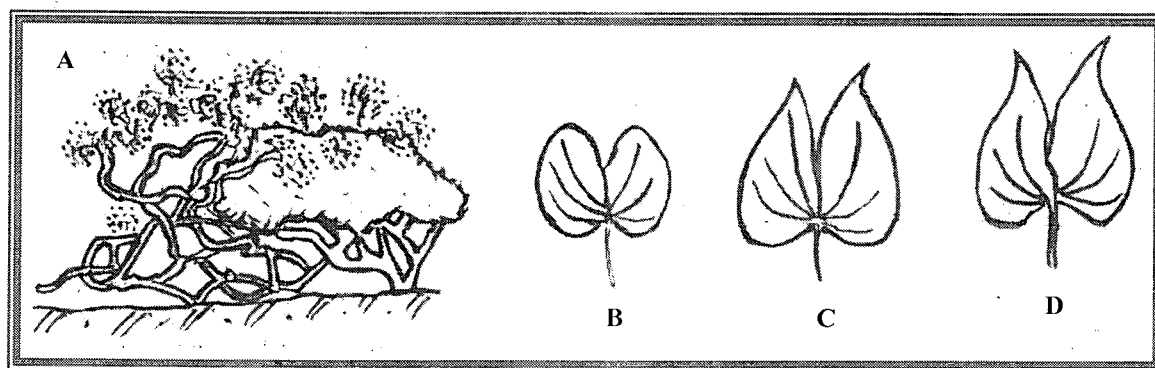




**Figura 2.** Aspectos botânicos (II) de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. Ramo (caule, folhas e flores) (A); cálice e androceu (B); pétala (C); gineceu (D) e legume (E).<sup>12</sup>



*Figura 3. Variação foliar em indivíduos de floresta ombrófila, locais abertos (A) e locais fechados (B).*<sup>14</sup>



*Figura 4. Arbusto escandente (A), variação foliar em indivíduos de locais abertos ou secos (B) e úmidos ou sombrios (C) e (D).*<sup>14</sup>



## *Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico*

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal estão as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Caesalpiniaceae, as quais podem ser encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta. Estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com estas plantas revelaram que os principais metabólitos secundários por elas produzidos são em geral flavonóides, triterpenóides e glicosídeos esteroidais. No Brasil, as plantas do gênero *Bauhinia* são conhecidas como pata-de-vaca, unha ou casco-de-boi.<sup>12</sup> Folhas, caules e raízes de *B. forficata*, *B. variegata*, *B. splendens*, *B. manca* e *B. rufescens*, são amplamente utilizadas em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, principalmente em infecções, processos dolorosos e diabetes.

### *Compostos isolados*

Muitas espécies do gênero *Bauhinia* foram e estão sendo estudadas com relação a constituição química; com isso, várias classes químicas e compostos de interesse medicinal foram isolados e relatados nesses últimos anos (Tabela 2), porém, muito pouco se conhece a respeito do potencial farmacológico desses compostos. É válido lembrar que além das espécies descritas, muitas outras são usadas indiscriminadamente como medicinais: *B. rufa*, *B. monandra*, *B. holophylla*, *B. smiliciana* etc, entretanto, não se sabe nada a respeito de suas composições.<sup>16</sup>

**Tabela 2.** Constituintes químicos isolados e identificados de espécies do gênero *Bauhinia*.

Espécies	Classes químicas	Compostos
<i>Bauhinia cardicans</i> <sup>17,18,19</sup>	Esteróides	$\beta$ -sitosterol (XL); campesterol (XLI); estigmasterol (XLII); colesterol; estigmasta-3,5-dieno-7-ona; sitosterol-3- $O$ - $\beta$ -glucosídeo; sitosterol-3- $O$ - $\alpha$ -D-xilurono-furanosídeo
	Flavonóides	campferol-3- $O$ - $\beta$ -rutinosídeo-7- $O$ - $\alpha$ -ramnopiranosídeo; campferol-3- $O$ - $\beta$ -rutinosídeo
	Alcalóides	trigonelina
	Álcoois	triacontanol
	Poliálcoois	3- $O$ -metil-D-inositol (D-pinitol)

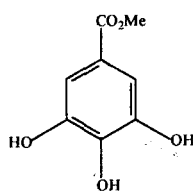


Tabela 2. Continuação...

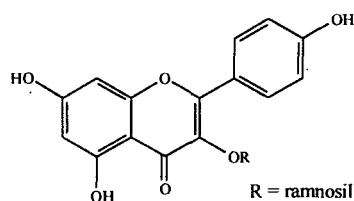
<i>Bauhinia monandra</i> <sup>31</sup>	Proteínas	Lectina
<i>Bauhinia purpurea</i> <sup>32,33 34,35, 36,37</sup>	Aminoácidos	ácido aspártico; ácido glutâmico; treonina; serina; prolina; glicina; alanina; valina; metionina; leucina; isoleucina; arginina; tirosina; fenilalanina; histidina; cistina; lisina; triptofano; tirosina
	Flavonóides	quercetina; 3,4-dihidroxichalcona-4- <i>O</i> - $\beta$ - <i>L</i> -arabinosil- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactopiranosídeo; isoquercitrina; astragalina; 5,6-dihidroxi-7-metoxiflavona-6- <i>O</i> - $\beta$ -D-xilopiranosídeo (LI); 6-(3'-Oxobutil)-taxifolina (XLVIII); buteína-4'- <i>O</i> - $\beta$ -arabino- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosídeo
	Ácidos graxos	ácido oleanólico
	Outros	6,8-dimetilcrisina
<i>Bauhinia racemosa</i> <sup>38,39</sup>	Cromanos tetracíclicos	pacharina ou dibenzo-(2,3-6,7)-oxepina; racemosol (XLV); De- <i>O</i> -metilracemosol
<i>Bauhinia reticulata</i> <sup>40</sup>	Flavonóides	quercetina
<i>Bauhinia rufescens</i> <sup>41</sup>	Estilbenóides	5,6-11-metoxi-2,2,12-trimetil-2 <i>H</i> -nafto-[1,2- $\epsilon$ ]-1-benzopirano-8-9-diol; 11-metoxi-2,2,12-trimetil-2 <i>H</i> -nafto-[1,2- $\epsilon$ ]-1-benzopirano-8-9-diol; 1,7,8,12b-tetrahydro-2,2,4-trimetil-2 <i>H</i> -benzo-[6,7]-ciclohepta-[1,2,3-de]- <sup>28</sup> -benzopirano-5,10,11-triol
<i>Bauhinia splendens</i> <sup>15,42</sup>	Flavonóides	quercetina; rutina
	Esteróides	$\beta$ -sitosterol; estigmasterol
	Benzenóides	galato de etila; bauspledina (XXXIX)
	Ácidos graxos	ácido esteárico
<i>Bauhinia tarapotensis</i> <sup>43</sup>	Flavonóides	luteolina-4'- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosídeo (XLVI)
	Ácido carboxílico	ácido-3-indol-carboxílico (LIII)
	Cetona	2,4-dihidroxi-2-(2-hidroxietil)-ciclohex-5-en-1-ona (LIV)
	Éster	éster cafeófilico do ácido apiônico (LII)
	Outros	(-)-isolariciresinol-3- $\alpha$ - <i>O</i> - $\beta$ -glucopiranosídeo; (+)-1,1-hidroxipiranoresinol-1- <i>O</i> - $\beta$ -glucopiranosídeo; isoacteosídeo (LV)
<i>Bauhinia tomentosa</i> <sup>44,45,46</sup>	Flavonóides	quercetina; rutina; isoquercitrina
	Proteínas	albumina; glutelina
<i>Bauhinia thonningii</i> <sup>47</sup>	Lactona	grinfonilida

Tabela 2. Continuação...

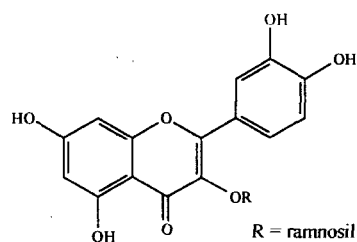
<i>Bauhinia uruguayensis</i> <sup>48</sup>	Flavonóides	quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo; campferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo
	Esteróides	estigmasterol; $\beta$ -sitosterol; estigmasta-3,5-dieno; campesterol; estigmasta-4,6-dien-3-ona; sitosterol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopiranosídeo; sitosterol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -D-riburonofuranosídeo; sitosterol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -D-xiluronofuranosídeo; sitosterol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-xilopiranosídeo; estigmasta-1,3,5-trieno
	Aminoácidos	ácido aspártico; ácido glutâmico; treonina; serina; prolina; colina; glicina; alanina; valina; metionina; leucina; isoleucina; tirosina; fenilalanina; histidina; triptofano
	Outros	alcanos; álcoois lineares
<i>Bauhinia vahlii</i> <sup>32,49</sup>	Esteróides	$\beta$ -sitosterol; campesterol; estigmasterol
	Flavonóides	quercetina; quercetina-3-glucosídeo; campferol; agathisflavona
	Triterpenóides	ácido betulínico
<i>Bauhinia variegata</i> <sup>50,51</sup>	Esteróides	$\beta$ -sitosterol
	Triterpenóides	lupeol
	Flavonóides	naringenina-5,7-dimetoxi-4-ramnoglicosídeo; campferol-3-galactosídeo; campferol-3-ramnoglicosídeo



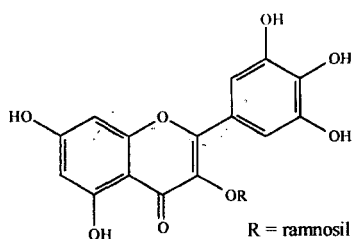
(XXXV)



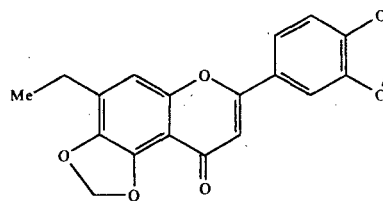
(XXXVI)



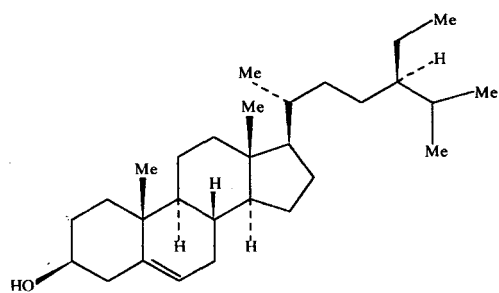
(XXXVII)



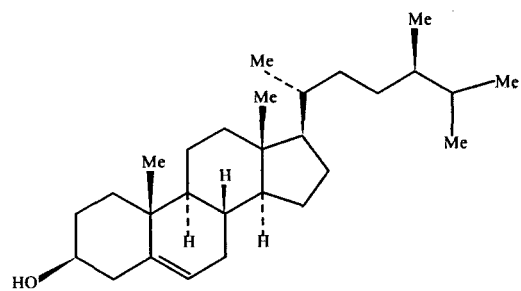
(XXXVIII)



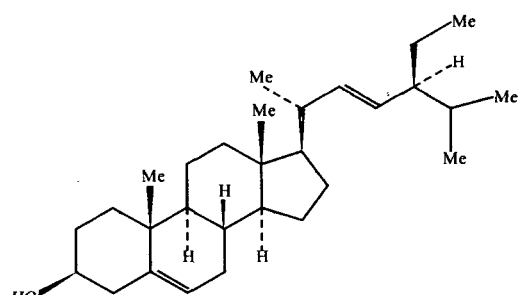
(XXXIX)



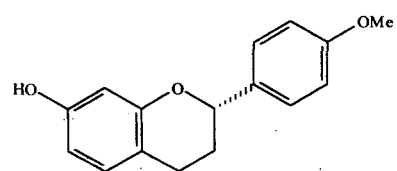
(XL)



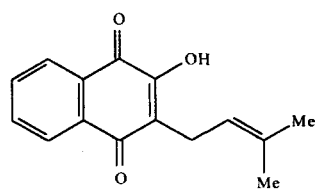
(XLI)



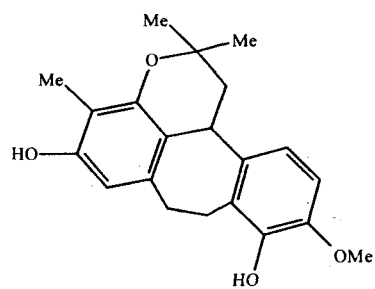
(XLII)



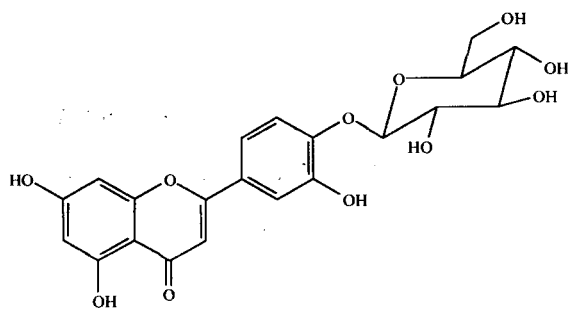
(XLIII)



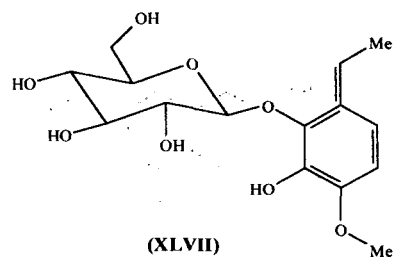
(XLIV)



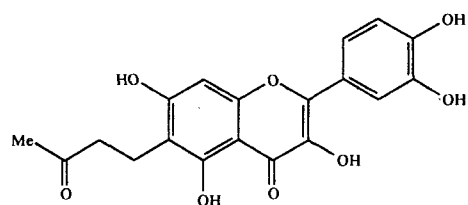
(XLV)



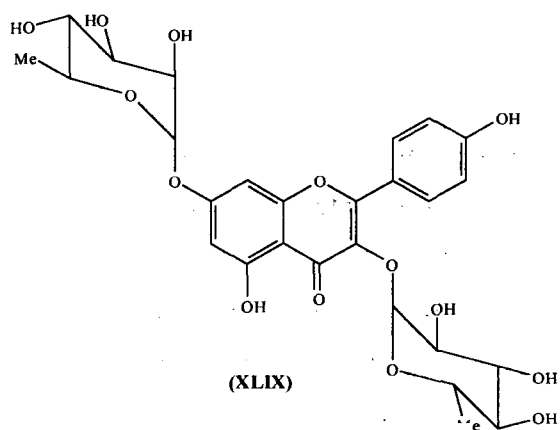
(XLVI)



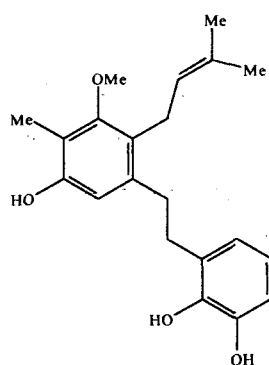
(XLVII)



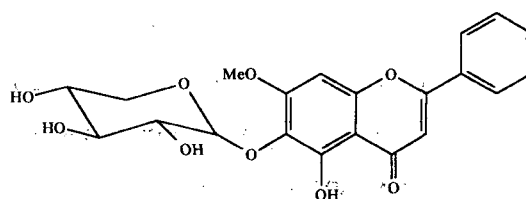
(XLVIII)



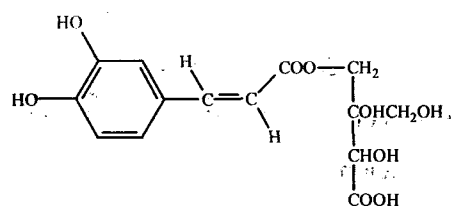
(XLIX)



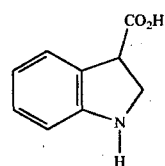
(L)



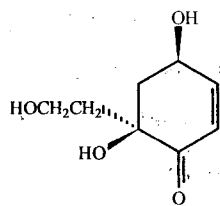
(LI)



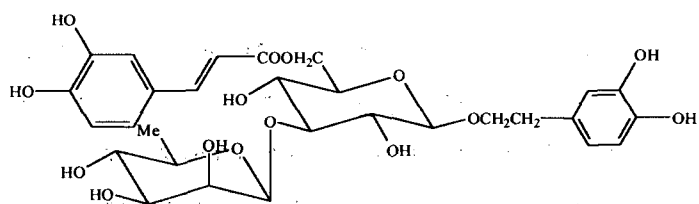
(LII)



(LIII)



(LIV)



(LV)

*Espécies com ação hipoglicemiante*

Das atividades biológicas, a mais relatada para o gênero *Bauhinia* é a hipoglicemiante, sendo a *B. forficata* a espécie mais utilizada medicinalmente e, conseqüentemente, a mais estudada. Conhecida popularmente por pata-de-vaca a *B. forficata* é usada principalmente na forma de chá, tintura e extrato fluído. É encontrada com bastante facilidade no mercado de fitoterápicos e é a espécie mais cultivada no Brasil sendo com freqüência usada na arborização urbana. Muitos estudos são antigos, como o relatado por Carmela Julian,<sup>52</sup> ressaltando o uso de *B. forficata* não só no tratamento do diabetes, mas também nos distúrbios endócrinos.

Russo e colaboradores demonstraram que a infusão preparada com folhas de *B. forficata* não apresentou efeito hipoglicemiante em pacientes com glicemia normal e em pacientes com diabetes Tipo II\*, enquanto que a ação hipoglicemiante do decocto da planta (150g/l) através da administração oral crônica em ratos diabéticos, fez com que os animais apresentassem uma melhoria no metabolismo de carboidratos, com conseqüente regularização dos níveis de glicemia e glicosúria.<sup>53-55</sup> De forma semelhante, estudos realizados por Volpato também demonstraram a ausência de atividade hipoglicemiante do extrato aquoso de folhas de *B. forficata* em ratas grávidas diabéticas, induzidas por streptozotocina.<sup>56</sup> Por outro lado, Damasceno e colaboradores verificaram recentemente que o extrato EtOH de suas folhas não reduz a concentração da glucose em ratos diabéticos induzidos pela streptozotocina.<sup>57</sup> Os resultados discrepantes podem ser devidos a vários aspectos não levados em consideração nestas investigações, como fatores ambientais relacionados à composição de solo, clima e fatores sazonais. Lemus e Knop demonstraram que o infuso de *B. cardicans* reduziu em 39% a glicemia em ratos induzida por aloxana e streptozotocina.<sup>58</sup> Almeida e colaboradores relataram que o extrato MeOH de *B. cheilantha* apresentou efeito hipoglicemiante na dose de 600mg/kg quando o diabetes foi induzida pelo aloxano (150mg/kg, i.p.).<sup>59</sup> Wazlavk demonstrou que polifenóis dos extratos EtOH/H<sub>2</sub>O de sementes de *B. variegata* possuem atividade hipoglicemiante (1000mg/kg) em ratos diabéticos induzidos pela streptozotocina (55mg/kg).<sup>60</sup> A avaliação dos extratos EtOH/H<sub>2</sub>O (500mg/kg) de *B. monandra* demonstrou, pelo método da glucose-oxidase, uma ação hipoglicemiante maior que a insulina.<sup>61</sup> Gonzalez-Mujica demonstrou que o

\* Diabetes Tipo II: não-insulino-dependente.

extrato aquoso de *B. megalandra* causou inibição da glucose-6-fosfatase, enzima relacionada ao controle da hiperglicemia no diabético.<sup>62</sup>

#### *Espécies com atividade microbiológica*

Savi e colaboradores<sup>63</sup> demonstraram que extratos de *B. splendens*, uma das poucas trepadeiras do gênero, mostram-se ativos quanto ao potencial antimicrobiano (teste da difusão em ágar), frente a bactérias patógenas tanto Gram-positivas quanto negativas. Compostos isolados de *B. manca* apresentaram significativa atividade antifúngica contra as espécies *Botrytis cinerea*, *Claviceps viridis*, *Coprinus cinereus*, *Rhizoctonia solani* e *Saprolegnia asterophora*.<sup>28</sup> Já o extrato DCM de cascas de *B. rufescens*, apresentou atividade antifúngica contra a espécie *Cladosporium cucumerinum*.<sup>41</sup> Estudos realizados com extratos C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, DCM e EtOH de folhas, caules e cascas de *B. forficata* revelaram que os mesmos não possuem atividade contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatis* e *Aspergillus niger*, porém, o extrato EtOH dos caules e o extrato C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> das cascas de *B. forficata* demonstraram moderada atividade contra o fungo *Epidermophyton floccosum*.<sup>16</sup> Souza, Santos e Bella-Cruz avaliaram a atividade antimicrobiana de *B. forficata* e *B. microstachya* pelo método da difusão em ágar. O estudo demonstrou que os extratos testados de *B. forficata* apresentaram baixa atividade contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e isenção de atividade para os extratos de *B. microstachya*.<sup>64</sup>

#### *Outras atividades do gênero*

Willain-Filho e colaboradores<sup>65</sup> demonstraram que os extratos EtOH/H<sub>2</sub>O e AcOEt de *B. splendens* apresentaram pronunciados efeitos analgésicos quando analisados no modelo de dor causada pelo ácido acético 0,6% em camundongos. Meyre-Silva<sup>30</sup> avaliou a mesma atividade para o extrato MeOH das folhas de *B. microstachya* e substâncias fenólicas isoladas a partir desse extrato e constatou a existência de uma relevante atividade analgésica nesse extrato. Ainda nesse estudo, é sugerido que



compostos fenólicos podem estar associados a essa analgésia, sendo necessário um maior número de modelos de estudo para se comprovar tal atividade. Carvalho<sup>66</sup> demonstrou que extratos de cascas dos caules de *B. guianensis* apresentam atividade antiinflamatória quando analisados no modelo de edema de pata de rato, induzido pela carragenina, dextrana e histamina. Também foi relatado neste estudo, uma atividade analgésica no modelo de dor causada pelo ácido acético. Asuzu e Onu<sup>67</sup> observaram que extratos EtOH das cascas de *B. thonningii* apresentam atividade antihelmíntica quando testados em *Ascaridia galli*. Panda<sup>68</sup> relatou que a administração diária de extratos de *B. purpurea* (2,5mg/kg, i.p.) em ratas com disfunção tiroídiana é capaz de aumentar a atividade da glucose-6-fosfatase, bem como diminuir a peroxidação lipídica hepática, aumentada pela atividade enzimática antioxidante. Kittakoop e Kirtikara<sup>27</sup> demonstraram que cromanos tetracíclicos (preracemosol A e B) isolados das raízes de *B. malabarica* apresentam moderada atividade antimalárica frente ao protozoário *Plasmodium falciparum*. Akhtar<sup>69</sup> estudou os extratos MeOH das flores de *B. racemosa* e verificou que apresentaram-se ativos em ratos na redução de úlceras gástricas induzidas pelo ácido acetilsalicílico. Substâncias isoladas do extrato MeOH das folhas de *B. tarapotensis* apresentaram relevante atividade antioxidante pelo método do DPPH,<sup>43</sup> bem como, Menezes,<sup>70</sup> relatou uma intensa atividade antioxidante no extrato EtOH bruto das folhas de *B. microstachya*, porém, outros estudos utilizando diferentes modelos são necessários para comprovação dessa atividade.

## Flavonóides como antioxidantes e ocorrência natural

Os flavonóides, do latim *flavus* (amarelo), englobam um grupo de compostos polifenólicos complexos que apresentam estruturas comum de esqueleto  $C_6C_3C_6$  caracterizadas por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) totalizando quinze átomos de carbono conforme mostra a Figura 5.<sup>71</sup>

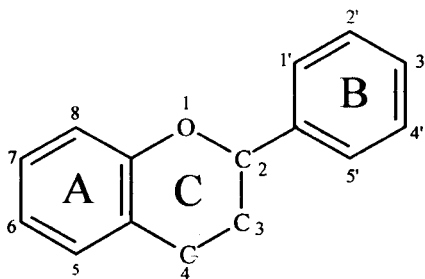


Figura 5. Estrutura básica de um flavonóide

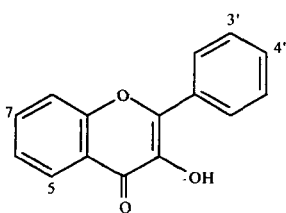
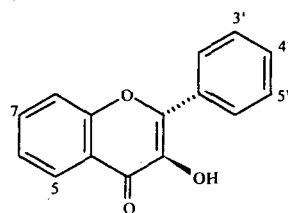
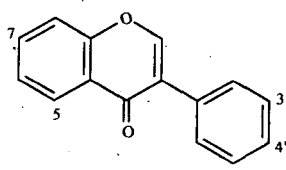
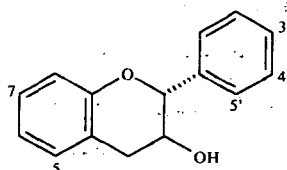
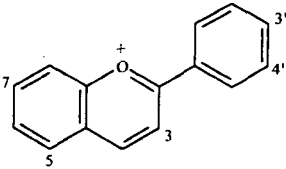
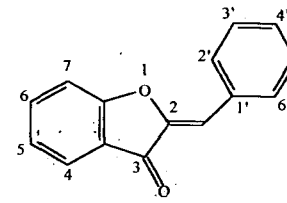
Várias categorias estruturais são relatadas e se diferem entre si pelo nível de oxidação e padrões de substituição dos anéis A e B. Entre as várias classes de flavonóides, as que mais nos interessam são as flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonóis, flavan-3-óis e antocianidina (Tabela 3). Taninos hidrolizáveis, protoantocianidinas (oligômeros de flavan-3-ol), cafeatos, cumarinas e ligninas são todas substâncias fenólicas, porém, usualmente são classificados separadamente.

Tabela 3. Estruturas de flavonóides.

Flavonas					Flavanonas				
	5	7	3'	4'		5	7	3'	4'
luteolina	OH	OH	OH	OH	hesperetina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
apigenina	OH	OH		OH	naringenina	OH	OH		OH
chrisina	OH	OH							

Tabela 3. Continuação...

Tab. 3. Continuação...

Flavonóis						Flavanonóis					
	5	7	3'	4'	5'		5	7	3'	4'	
quercetina	OH	OH	OH	OH		taxifolina	OH	OH	OH	OH	
campferol	OH	OH		OH							
galangina	OH	OH									
fisetina		OH	OH	OH							
miricetina	OH	OH	OH	OH	OH						
											
Isoflavonas						Flavan-3-ol					
	5	7		4'			3	5	7	3'	4' 5'
genisteína	OH	OH		OH		(+)-catequina	$\beta$ OH	OH	OH	OH	OH
genistina	OH	O-glu		OH		(-)-epicatequina	$\alpha$ OH	OH	OH	OH	OH
daidzeína		OH		OH		(-)-epigallocatequina	$\alpha$ OH	OH	OH	OH	OH OH
daidzina		O-glu		OH							
biochanina A	OH	OH		OCH <sub>3</sub>							
formononetina		OH		OCH <sub>3</sub>							
											
Sal Flavilium						Auronas					
	3	5	7	3'	4'		6	7	3'	4'	
cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	hispidol	OH			OH	
cianina	O-glu	OH	OH	OH	OH	sulfuretina	OH		OH	OH	
pelargonidina	OH	OH	OH		OH	maritimetina	OH	OH	OH	OH	
											

Flavonóides geralmente ocorrem em plantas na forma de glicosídeos e contribuem nas tonalidades vermelho, azul e laranja de suas folhas, flores e frutos. Podem ser encontrados em nozes, avelãs, grãos, condimentos, chás, extratos de plantas medicinais e em algumas bebidas, sobretudo no vinho (particularmente vinho tinto) e até mesmo em cervejas. Exemplificando, a flavona apigenina e luteolina, são comuns em grão de cereais e ervas aromáticas (salsa, alecrim, tomilho) enquanto que, seu análogo hidrogenado hesperetina e naringenina são encontrados quase exclusivamente em frutas cítricas. Os flavononóis quercetina e campferol, encontrados predominantemente nas cascas de frutas e vegetais, são os mais comuns. Isoflavonas são encontradas com frequência na maioria dos legumes como a soja, feijão preto e verde, ervilhas, alfafa e sementes de girassóis. Flavan-3-óis, (+)-catequinas, (-)-epicatequinas, (-)-epigallocatequinas e seus ésteres galatos estão amplamente distribuídos nas plantas, principalmente nas folhas. Protoantocianidinas (oligômeros de flavan-3-ol) são comuns em uvas, maçãs, groselha-preta, grãos de cevada, sorgo etc. Antocianidinas e seus derivados glicosilados (antocianinas) são os pigmentos naturais mais comuns encontrados na natureza, sendo abundantes em uva vermelha.

Os flavonóides desempenham diferentes papéis na ecologia das plantas. Pelas suas colorações, flavonas, flavonols e antocianidinas funcionam muitas vezes como atrativos de insetos na polinização. A adstringência das catequinas e flavanóis funcionam como defesas das plantas contra insetos nocivos. Flavonóides agem também como catalisadores da fase clara da fotossíntese e reguladores de ferro na fosforilação, atuando também como antioxidantes naturais, inibindo as ERO produzidas durante o transporte de elétrons do processo fotossintético. Além disso, devido sua favorável absorção de luz UV, protegem as plantas das radiações nocivas do sol.<sup>72</sup>

Flavonóides são considerados substâncias não nutrientes e devido às suas propriedades antioxidantes, têm atraído a atenção da comunidade científica na nutrição preventiva, evitando importantes patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento, câncer entre outras.<sup>73,74</sup> Existem vários relatos de que os flavonóides exibem uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo ação antimicrobiana<sup>75-78</sup> antiviral, antiinflamatória,<sup>79</sup> analgésica<sup>30</sup> e antialérgica.<sup>80</sup> Inibem *in vitro* a lipoperoxidação, a agregação plaquetária, a permeabilidade e fragilidade capilar e a atividade de enzimas como a ciclo-oxigenase e a lipoxigenase. No caso da lipoperoxidação ainda quando está no estágio de propagação, substâncias

flavônicas podem atuar como bloqueadores das reações em cadeia, provocadas pelos radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ).<sup>81</sup> Oferecem proteção ao DNA e também são *scavengers*\* de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado uma significativa correlação inversa entre o consumo de flavonóides e a mortalidade por doenças cardiovasculares.<sup>4,76,80</sup>

A atividade antioxidante dos flavonóides relaciona-se ao fato de atuarem como seqüestradores de ERO e quelantes de cátions divalentes ( $\text{Fe}^{++}$  e  $\text{Cu}^{++}$ ), principais formadores de ERO (Figura 6).

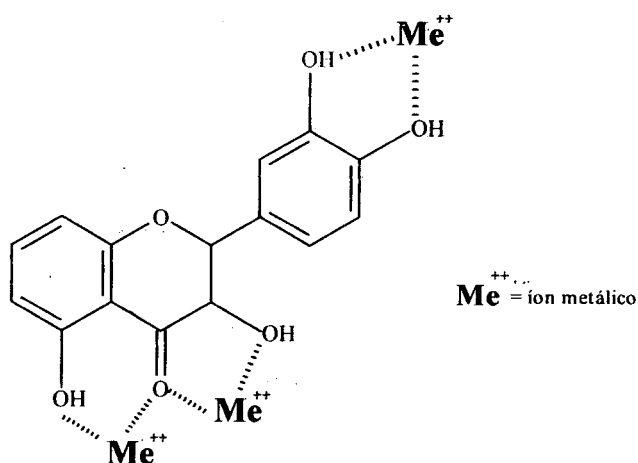
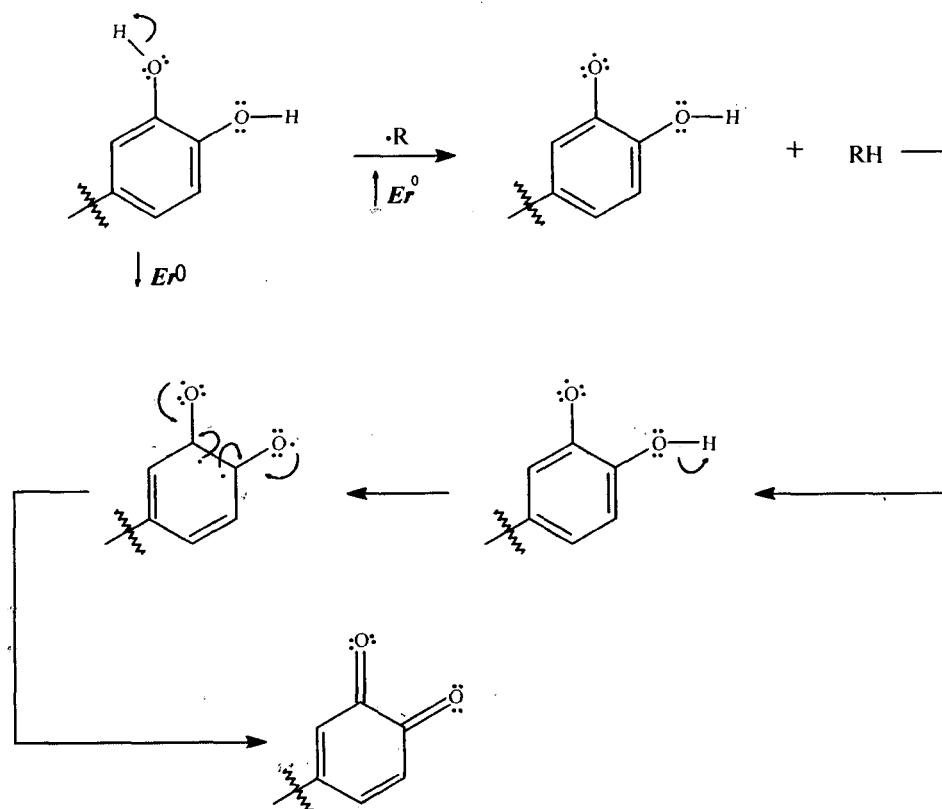


Figura 6. Flavonóides como quelantes de íons metálicos bivalentes.

\* *Scavengers*: Designação dada a propriedade dos flavonóides de reagir com radicais livres inativando-os. "Coletores, varredores, limpadores" de radicais livres.

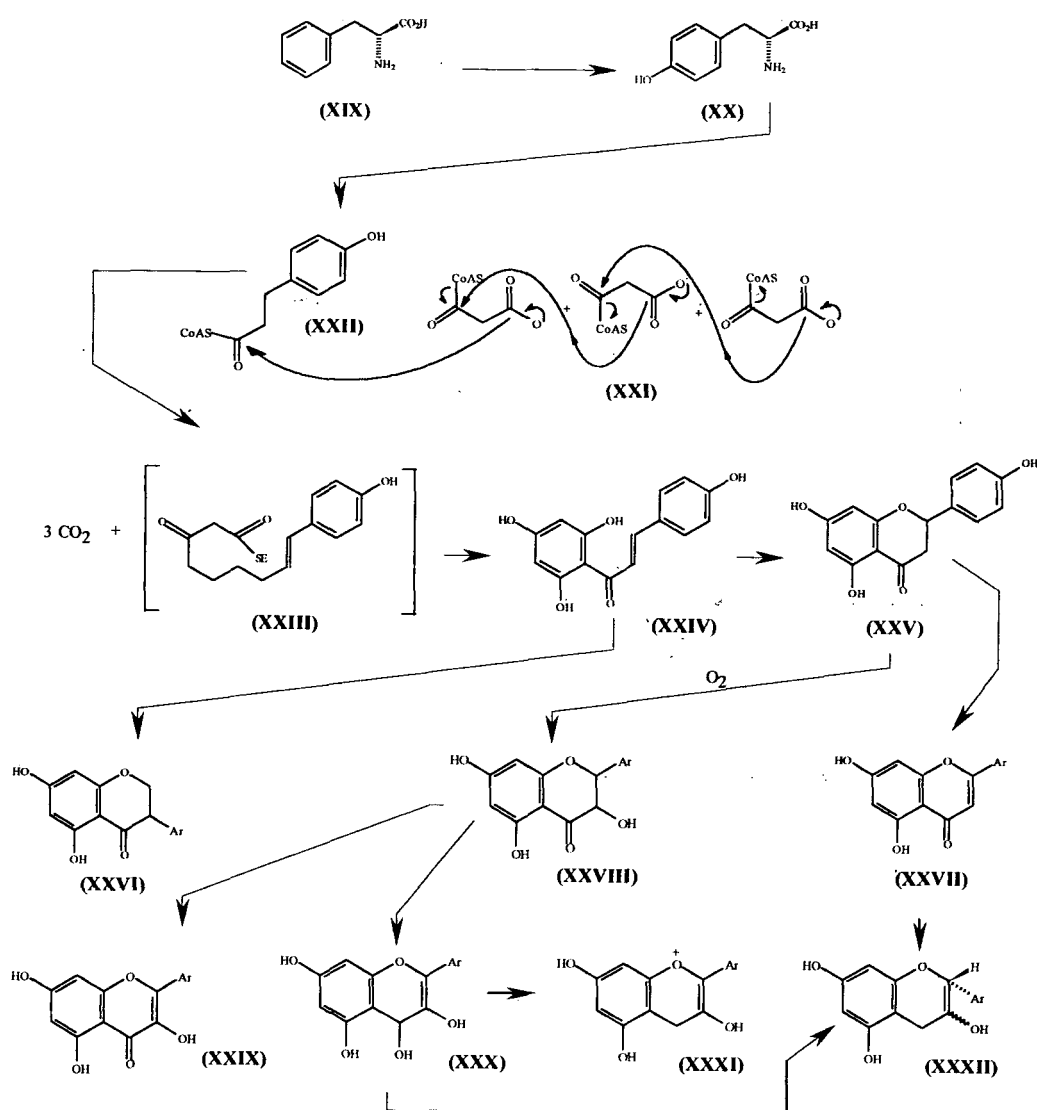
Têm sido proposto que os flavonóides inibem essas reações através da doação de átomos de hidrogênios aos radicais hidroxil e peroxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ), dessa forma, a presença de um sistema 2',3'-orto-dihidroxi no anel B de um esqueleto flavônico confere alta estabilidade à forma radicalar, processo chave na deslocalização eletrônica e terminação da cadeia de propagação. Também é observado que grupos 3-OH e 5-OH com função 4-oxo no anel A potencializam a atividade antioxidantes dos flavonóides (Esquema 1).<sup>72,82,83</sup>



Esquema 1. Flavonóides como terminadores de reações de cadeia.

## Biossíntese de flavonóides

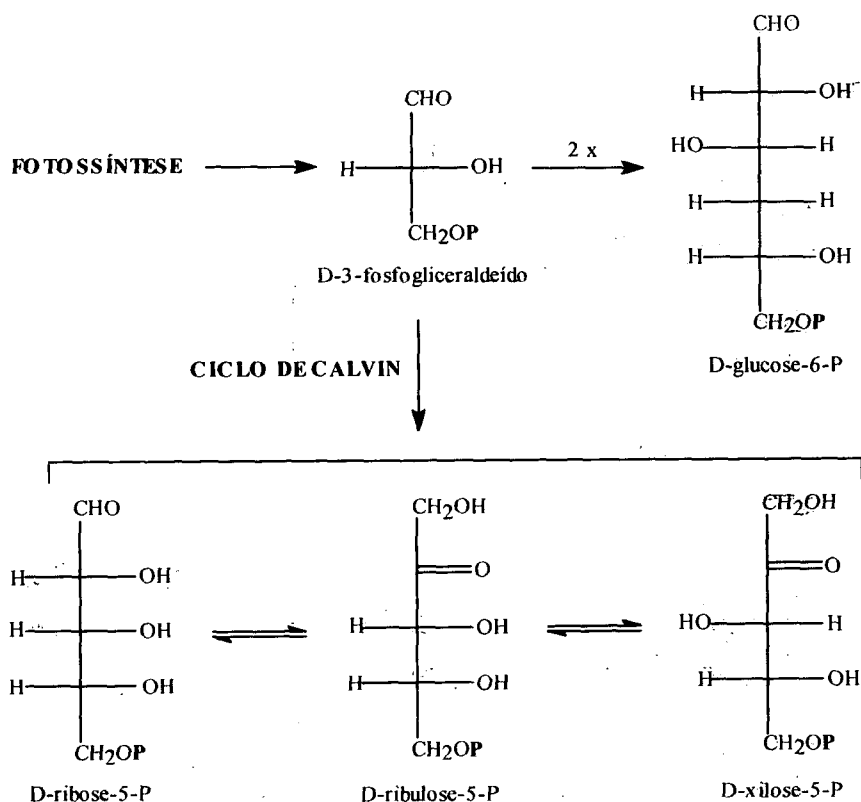
A biossíntese dos flavonóides se dá a partir das vias químicas do acetato e do xiquimato, onde o ácido *p*-hidroxicinâmico (XXII), derivado da fenilalanina (XIX) e tirosina (XX), é condensado com três moléculas de malonil coenzima A (XXI), fornecendo um intermediário policetídeo (XXIII) de cadeia aberta que ao ser fechado forma a naringina-chalcona (XXIV), estrutura chave para a síntese das flavanonas (XXV), isoflavanonas (XXVI), flavonas (XXVII), flavanonóis (XXVIII), flavonóis (XXIX), flavan-3,4-dióis (XXX), antocianidinas (XXXI) e catequinas (XXXII) conforme o Esquema 2.<sup>84</sup>



Esquema 2. Biossíntese de flavonóides.

### Carboidratos: definição e biossíntese

Dos constituintes químicos presentes em plantas, animais e microorganismos, os carboidratos são os que representam o maior número. São sintetizados pelo metabolismo primário, essencial a todos os organismos e, quando polimerizados, funcionam como componentes de reserva e estruturais da parede celular dos organismos. Do ponto de vista químico, monossacarídeos são polihidroxiáldeídos (aldoses) ou polihidroxicetonas (cetoses). São os primeiros produtos formados pela fotossíntese (Esquema 3).



Esquema 3. Representação dos primeiros açúcares formados pela fotossíntese.

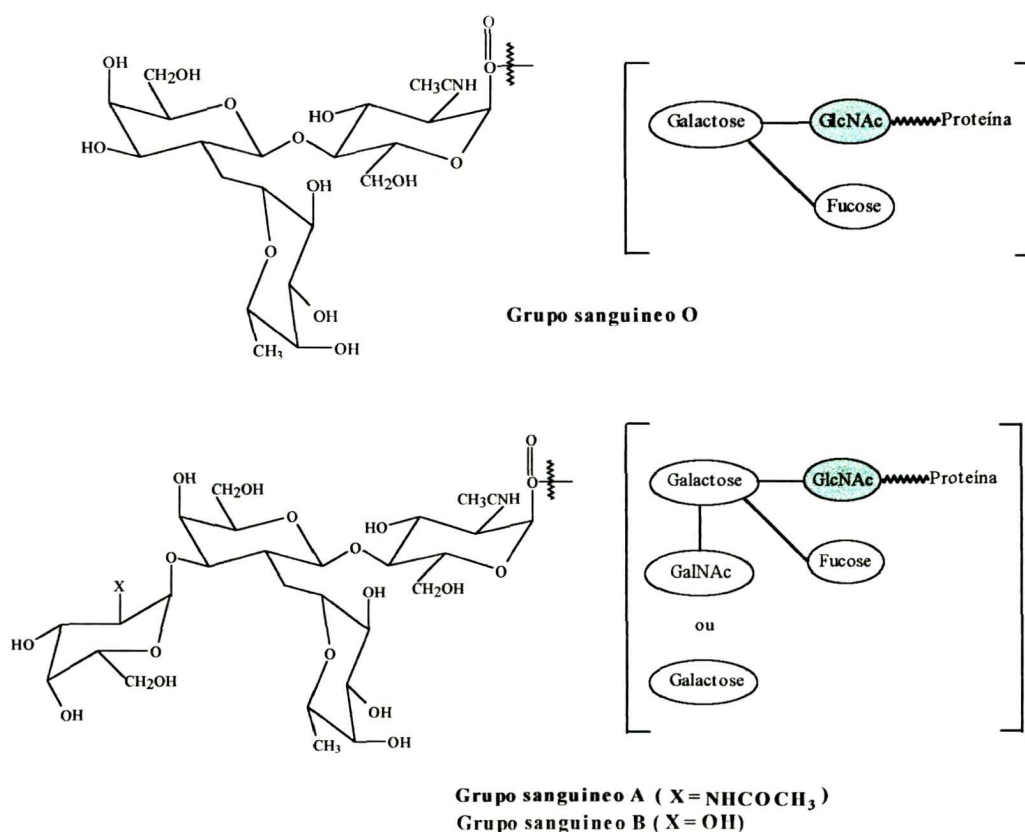
São constituídos de três a sete átomos de carbonos com cadeias lineares alifáticas, porém, há relatos de monossacarídeos com oito, nove e até dez átomos de carbono. Entretanto, na natureza, são os monossacarídeos com cinco (pentoses) e seis (hexoses) átomos de carbono os mais frequentes em polissacarídios vegetais.<sup>85</sup>

Quimicamente, pentoses e hexoses possuem estruturas cíclicas (furanosídicas e piranosídicas) resultantes de reações intermoleculares do grupo carbonílico em C-1 ou



C-2 com grupos hidroxílicos em C-4 ou C-5 de suas próprias cadeias alifáticas, correspondendo em um hemiacetal cíclico.<sup>86</sup>

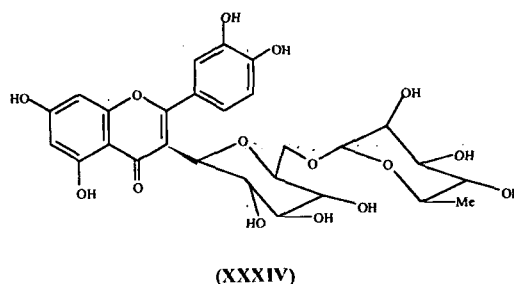
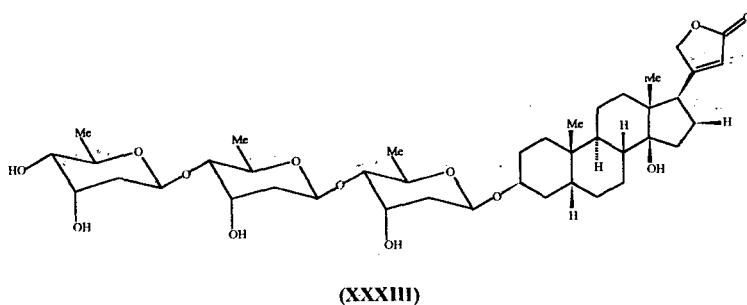
Houve época em que se pensava que os carboidratos eram compostos poucos interessantes, cuja utilidade biológica era servir como suporte estrutural e fonte de energia. Sabemos que carboidratos preenchem esse papel, porém, sabe-se agora que eles desempenham muitas outras funções bioquímicas importantes. Um exemplo é o caso dos antígenos dos grupos sanguíneos humanos A, B e O, onde pequenas cadeias polissacarídicas unidas glicosidicamente a grupos hidroxila de proteínas (glicoproteínas) atuam como marcadores bioquímicos na superfície das células, processo pelo qual um tipo de célula reconhece a outra (Figura 7).<sup>87</sup>



**Figura 7.** Estruturas de determinantes antigênicos dos grupos sanguíneos A, B e O (D-galactose, α-fucose, GluNAc = N-acetilglucosamina, Glc = N-acetilgalactosamina).

Muitos metabólitos secundários quimicamente ativos derivam do metabolismo dos carboidratos, sendo clara a relação do metabolismo primário das plantas em geral com as vias do acetato, xiquimato e mevalonato. Um exemplo dessa relação é a

digoxina (XXXIII), substância extraída da *Digitalis purpurea* usada no tratamento de doenças do coração, é um glicosídeo de um álcool esteróide complexo e um trissacarídeo composto por estruturas de D-digitoxose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). De forma semelhante, flavonóides, em elevadas proporções também podem apresentar unidades monossacarídicas em suas estruturas. A rutina (XXXIV) por exemplo, um flavonol com pronunciada atividade antioxidante tanto em testes *in vitro* como *in vivo*, presente em diversas espécies de leguminosas, apresenta unidades de glucose e ramnose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) ligadas à posição 3 do esqueleto flavônico.<sup>71,85</sup>



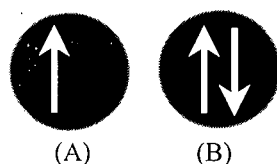
Recentemente, estudos realizados com plantas coletadas na região da Hidrelétrica de Salto Caxias, Paraná, demonstrou que a espécie *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiniaceae, uma liana conhecida popularmente por escada-de-macaco,<sup>12</sup> possui relevante atividade antioxidante quando comparada ao padrão ácido ascórbico.<sup>70</sup> Dados de literatura também sugerem um possível efeito antinociceptivo para essa espécie e que compostos fenólicos glicosilados podem estar relacionados a tal atividade.<sup>30</sup> No entanto, muito pouco se sabe sobre sua química e nada se conhece sobre os açúcares que a compõe.

### *Danos celulares, radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO)*

Como visto no caso dos flavonóides e biflavonóides das folhas da *Ginkgo biloba*, a procura por novas substâncias antioxidantes, especialmente de origem natural, têm sido objeto de vários estudos. Para combater o perigo do estresse oxidativo causado pelos radicais livres, em condições normais, os organismos, plantas e animais possuem mecanismos de defesa próprios (antioxidantes) cuja eficiência tende a decrescer com a idade tornando-os insuficientes, dessa forma, em humanos, o desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes (*glutathione peroxidase*, *glutathione reductase*, *superóxido dismutase* e *catalase*) pode provocar um número grande de desordens celulares tais como, peroxidação lipídica, danos proteicos-enzimáticos e inclusive, alterações no DNA, levando o indivíduo a um estado clínico, podendo estar associado a desordens do trato respiratório, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e envelhecimento precoce.<sup>72,74,88</sup>

Várias são as causas bioquímicas capazes de produzir lesões e morte celular. Dessas causas, uma delas é a hipoxia, caracterizada pela falta de suprimento de sangue (isquemia) devido a processos relacionados a arteriosclerose ou trombose que impedem que o O<sub>2</sub> chegue as células. Dependendo do estado de hipoxia, poderá ocorrer adaptação, lesão ou morte celular. Agentes físicos e químicos como temperaturas muito altas ou baixas, mudanças bruscas de pressão, radiação e choques elétricos também podem danificar em maior ou menor grau as nossas células. Simples componentes como glucose ou NaCl em concentrações hipertônicas, O<sub>2</sub> em excesso, arsênico, cianeto, sais de mercúrio, poluentes atmosféricos (CO, NO, SO<sub>2</sub>), inseticidas, herbicidas, álcoois, cocaína, entre outras substâncias narcóticas, podem destruir um número de células suficientes para causar danos e morte celular em minutos ou horas. Agentes infecciosos como bactérias, fungos, protozoários e outras formas de parasitas impedem, em alguns casos, a homeostase, podendo também produzir substâncias tóxicas às células. Dos agentes químicos nocivos às células, os radicais livres por serem produzidos pelo próprio metabolismo celular, talvez sejam os mais comentados e estudados.<sup>89</sup>

Um radical livre, ou simplesmente um radical, pode ser definido como qualquer espécie química, orgânica ou inorgânica, que contenha um número ímpar de elétrons, portanto, elétrons desemparelhados (Figura 8).



**Figura 8.** Representação de orbitais mais externos de uma espécie química radicalar (A) e não radicalar (B).

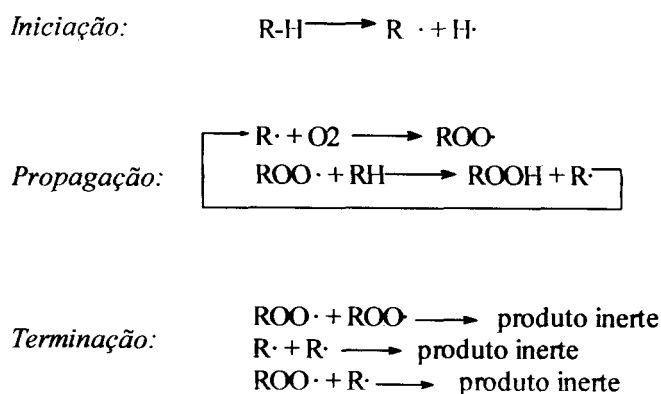
Exemplos que ilustram essa definição podem ser vistos na Tabela 4.<sup>90</sup>

**Tabela 4.** Alguns exemplos de radicais livres.

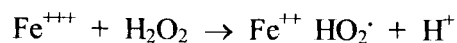
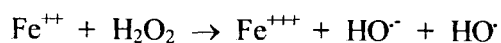
Espécies	Nomes
$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}\cdot$	radical acetila ou acetato
$\text{CH}_3\cdot$	radical metila
$\text{C}_6\text{H}_5\cdot$	radical fenila
$\text{Na}\cdot$	átomo de sódio
$\text{Cl}\cdot$	átomo de cloro radical
$\text{C}_6\text{H}_5^-$	ânion radical benzeno

Desconsiderando as fontes de radiação e o uso de peróxidos industriais, na natureza, duas substâncias importantes estão relacionadas a formação de radicais livres e espécies não radicalares de alta reatividade: o gás oxigênio ( $\text{O}_2$ ) e o óxido nítrico (NO), poluente atmosférico, mas que também resulta de processos metabólicos que ocorrem no interior das células de organismos aeróbios. O NO, através de reações de natureza bioquímica, leva a formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), o qual, mesmo não sendo um radical, pela sua alta reatividade torna-se uma espécie tóxica em proporções anormais, promove a oxidação de grupos tiólicos, em particular a glutathione, causando assim, como os radicais livres, degenerações celulares. O  $\text{O}_2$ , pelo fato de possuir dois elétrons livres nos orbitais *p* antiligantes, reage preferencialmente com moléculas de configuração eletrônica semelhante. Como a maioria das moléculas geradas pelo metabolismo não possuem essa característica, o  $\text{O}_2$  fica impedido, por restrição de *spin*, de reagir. Dessa forma, alvos celulares importantes são evitados. Na forma de oxigênio singlete, a restrição de *spin* desaparece conferindo a ele um maior poder oxidante que, por absorção de energia ou por transferência de elétrons, pode dar origem a diversas outras espécies químicas, as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO).<sup>88</sup> Uma via de formação de ERO consiste na redução do  $\text{O}_2$  com conseqüente geração de peróxido

de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radicais ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), radicais alcóxil ( $\text{RO}^\cdot$ ), radicais peróxil ( $\text{ROO}^\cdot$ ) e radicais hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ), sendo essa última a mais deletéria das ERO que juntamente com o  $\text{ROO}^\cdot$  são capazes de proporcionar reações de iniciação (Esquema 4).<sup>72,82,91</sup> O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apesar de ser uma espécie não radicalar, é tóxico ao organismo e sua reação de decomposição pode ser catalisada pelo íon ferroso ( $\text{Fe}^{++}$ ) levando à formação do radical  $\text{HO}^\cdot$ , como mostra a reação de Fenton\* descrita pela primeira vez em 1894 (Esquema 5).<sup>90,92</sup>



**Esquema 4.** Fases de uma reação em cadeia (iniciação, propagação e terminação).



**Esquema 5.** Reação de Fenton

\* Descoberta por Fenton em 1894, o mecanismo desta reação, aceito até os dias de hoje, foi proposto por Haber e Weiss em 1932.<sup>90</sup>



## 2

---

*Objetivos*

---

*Objetivos gerais*

1. Estudar a atividade antioxidante de extratos obtidos das folhas e caules de *B. microstachya*.
2. Isolar e identificar alguns dos constituintes químicos majoritários das folhas de *B. microstachya*.

*Objetivos específicos*

1. Determinar *in vitro* o potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de folhas e caules de *B. microstachya*.
2. Determinar a composição monossacarídica das folhas de *B. microstachya*.
3. Isolar componentes do metabolismo secundário com atividade antioxidante das folhas de *B. microstachya*.





## 3

## Resultados e discussão

### Abordagem fitoquímica

#### Extração e rendimento dos extratos

#### Teor de flavonóides

#### Ensaio antioxidantes

- Redução do complexo fosfomolibbdênico
- Redução do DPPH
- CCD

#### Determinação estrutural de BM2, BM4 e BM5

#### Ensaio antimicrobiano

#### Composição monossacarídica das folhas de *B. microstachya*

### Abordagem fitoquímica

Folhas e caules de *B. microstachya*, espécie conhecida popularmente por escada de macaco,<sup>14</sup> foram coletados em Morretes-PR, região de Mata Atlântica, a 80km da capital Curitiba (Figura 9). Parte desse material (100g), foi macerado em EtOH 70% (96h), concentrado em rotavapor (40°C) e submetido a ensaios fitoquímicos segundo metodologia clássica descrita por Matos em 1988.<sup>93</sup> Dessa forma, ficou evidenciado a presença de flavonóides e taninos\* nas folhas e nos caules de *B. microstachya*. Os flavonóides foram confirmados por reação em cromatografia em camada delgada (sol. Np/PEG\*\* como sol. reveladora) e os taninos por reação de precipitação com sol. de FeCl<sub>3</sub> 10% (Tabela 5).

Das classes de constituintes químicos encontradas em folhas, caules, cascas e raízes do gênero *Bauhinia*, a grande maioria delas se referem a constituintes polifenólicos, esteróides e triterpenóides. Desses, os flavonóides são os que melhores se distribuem e foram encontrados em quase todas as espécies pesquisadas. Em nenhuma dessas, assim como na escada-de-macaco, foi constatado a presença de alcalóides (exceção *Bauhinia cardicans*) e óleos voláteis (Tabela 5).

\* **Taninos:** mistura de constituintes polifenólicos de difícil cristalização e separação. São solúveis em solventes polares, H<sub>2</sub>O, MeOH e EtOH, precipitam proteínas, reagem com sol. FeCl<sub>3</sub> (10%) formando precipitados azuis ou violetas (taninos hidrolizáveis) e verdes (taninos condensados). Diversas atividades são relatadas a esta classe de compostos, entre elas, destaca-se a antioxidante.<sup>94, 95</sup>

\*\* **Np/PEG:** sol. 1% de difenilboriloxietilamina em MeOH/sol. 5% polietilenoglicol 4000 em EtOH.<sup>96</sup>



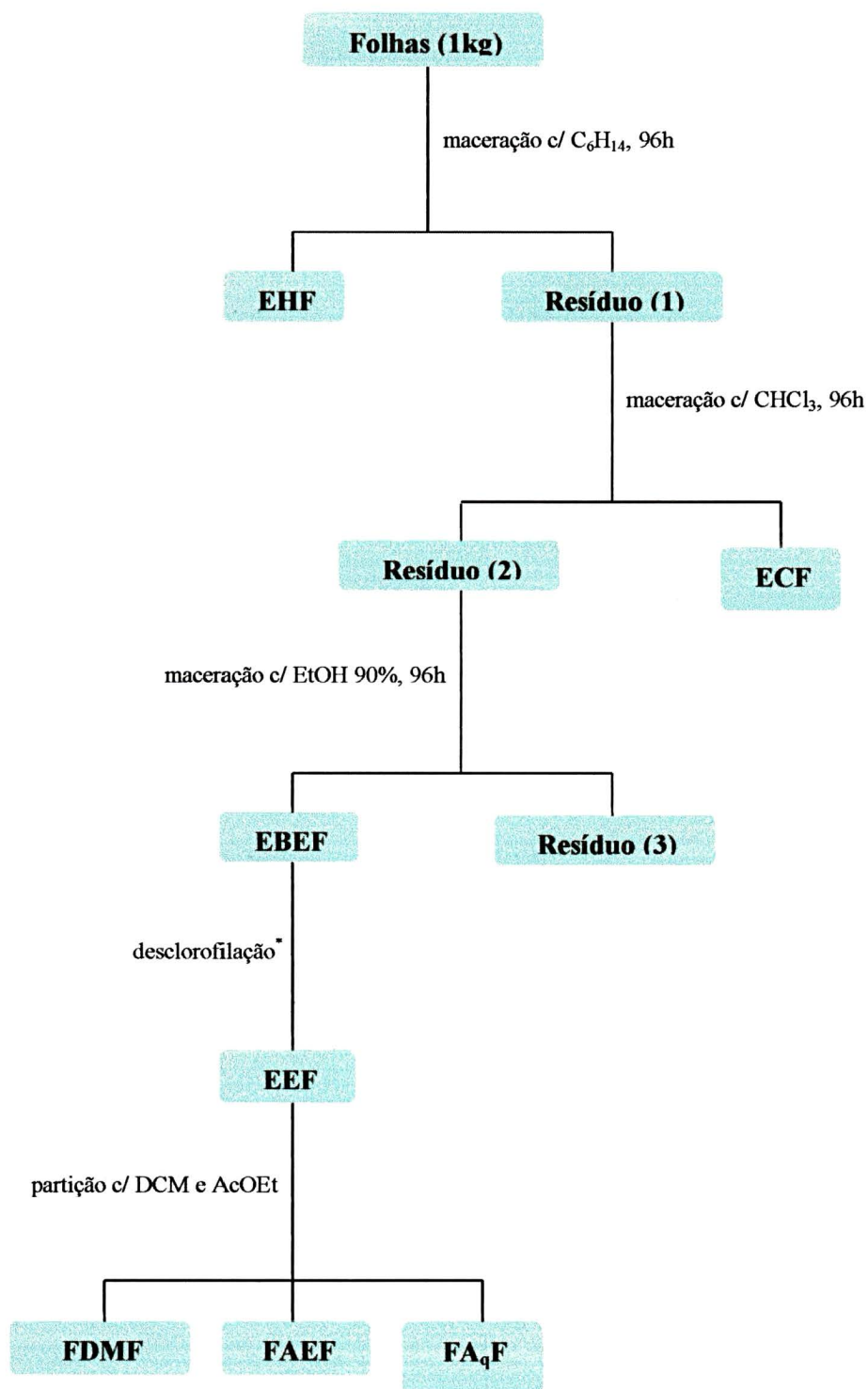
**Figura 9.** Algumas regiões de coleta de *B. microstachya* no Estado do Paraná com registros em herbário (MBC e UFPR). Curitiba (A), Morretes (B), Antonina (C), Paranaguá (D), Guaratuba (E), Guaraqueçaba (F), Laranjeiras do Sul (G), Cascavel (H), Medianeira (I), São Miguel do Iguaçu (J) e Foz do Iguaçu (K).<sup>97</sup>

**Tabela 5.** Classes químicas encontradas em folhas e caules de *B. microstachya*.

Classe química	Reações	Parte usada	Resultados
Flavonóides	Reação c/ Np/PEG (CCD)	Folhas	Positivo
		Caules	Positivo
Antocianinas	Teste colorimétrico (pH 3; 8,5 e 11)	Folhas	Negativo
Antocianidinas	Teste colorimétrico (pH 3; 8,5 e 11)	Caules	Negativo
Taninos	Reação c/ FeCl <sub>3</sub> 10%	Folhas	Positivo
		Caules	Positivo
Esteróides	Reação de Lieberman-Burchard	Caule	Negativo
Triterpenos	Reação de Lieberman-Burchard	Folhas	Negativo
Alcalóides	Reativos gerais de alcalóides: Hager, Mayer e Dragendorf	Caule	Negativo
		Folhas	Negativo
Saponinas	Formação de espumas	Caule	Negativo
		Folhas	Negativo

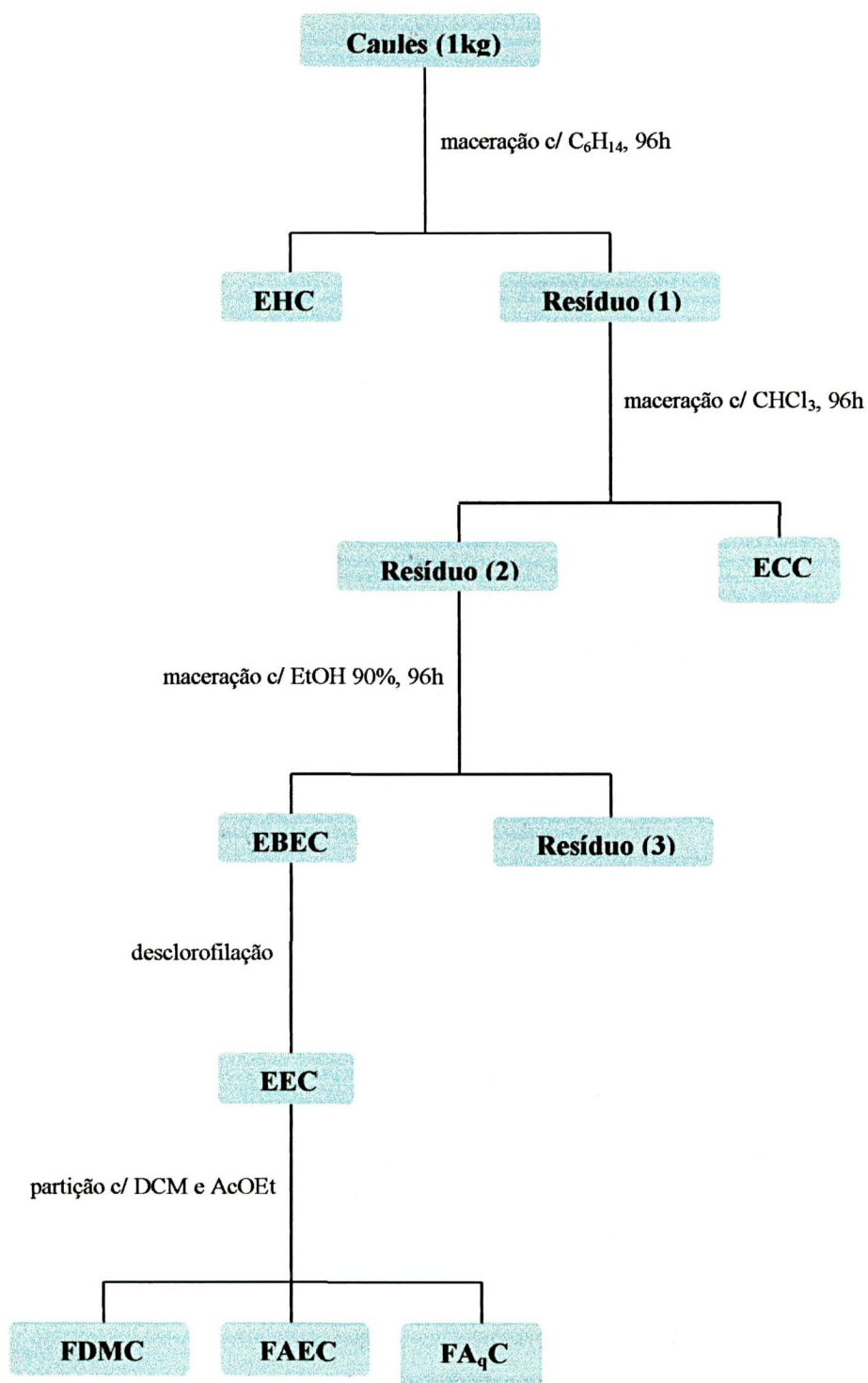
### *Rendimento dos extratos obtidos a partir dos Esquemas 6, 7 e 8*

Quatorze foram os extratos obtidos a partir do Esquema 6 e 7 e quatro foram os extratos obtidos a partir do Esquema 8.



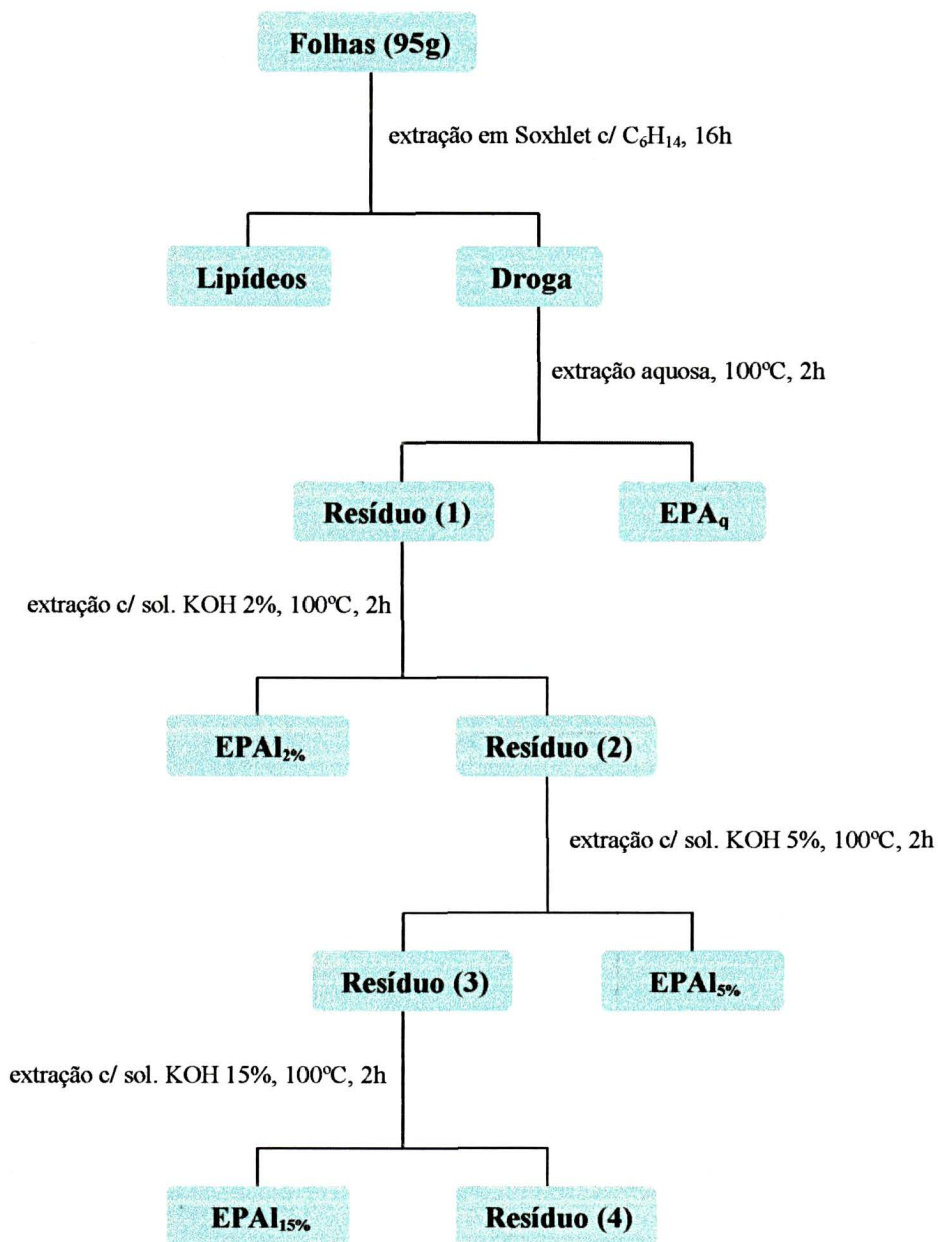
**Esquema 6.** Obtenção de extratos (metabólitos secundários) a partir de 1kg de folhas de *B. microstachya*.

\* Os extratos EBEF e EBEC foram concentrados em rotavapor (40°C), agitados mecanicamente em banho-de-gelo (8h) e depositados sob refrigeração (24h). Dessa forma, grande parte da clorofila precipitou, sendo separada dos extratos por filtração sob pressão reduzida.



*Esquema 7. Obtenção de extratos (metabólitos secundários) a partir de 1kg de caules de B.microstachya.*





**Esquema 8.** Obtenção dos extratos (metabólitos primários) a partir de 95g de folhas de *B. microstachya*.

Desses, os extratos EBEF e EBEC apresentaram maior rendimento, 9,15g% e 3,78g% respectivamente. A fração FAEF, de onde foram isolados quatro componentes, apresentou um rendimento de 2,60g% (Tabela 6).

**Tabela 6.** Rendimento dos extratos obtidos a partir dos Esquemas 6 e 7.

Extratos	(g%) <sup>*</sup>	Extratos	(g%) <sup>*</sup>
EHF	0,90	EHC	0,40
ECF	0,52	ECC	0,13
EBEF	9,15	EBEC	3,78
EEF	7,93	EEC	3,38
FDCMF	0,09	FDCMC	0,11
FAEF	2,60	FAEC	1,58
FA <sub>q</sub> F	2,00	FA <sub>q</sub> C	1,57

Para os extratos polissacarídicos, o maior rendimento foi observado nas extrações alcalinas, sendo que, quanto maior a concentração do álcalis utilizado (sol. KOH), maior foi o rendimento dos extratos obtidos (Tabela 7).

**Tabela 7.** Rendimento dos extratos obtidos a partir dos Esquemas 8.

Extratos	(g%) <sup>*</sup>	Extratos	(g%) <sup>*</sup>
EPA <sub>q</sub>	0,63	EPA <sub>15%</sub>	4,45
EPA <sub>12%</sub>	1,90	EPA <sub>15%</sub>	5,50

### Teor de flavonóides

O teor de flavonóides presente nas folhas de *B. microstachya*, foi determinado através de técnica descrita pela Pharmacopoea Helvetica<sup>98</sup> padronizada para o doseamento de flavonóides totais encontrados no gênero *Passiflora* que reagem com AlCl<sub>3</sub>. O resultado foi expresso tendo o hiperosídeo C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub> (M: 464,4 g/mol<sup>-1</sup>) como substância de referência, sendo o valor, determinado pela equação:

$$\% \text{Flavonóides} = \frac{A \cdot 1,25}{m}$$

Onde: A = absorbância à 422nm, m = massa da substância em gramas.

<sup>\*</sup> g%: massa de extrato obtida (g) a partir de 100g de vegetal.

O teor de flavonóides encontrado nas folhas de *B. microstachya* (600mg) foi de  $0,12\% \pm 0,003$  ( $n = 5$ ), o que sugere que em 1kg de droga, massa de folhas usada no início dos fracionamentos, poderia ser encontrado caso o rendimento fosse próximo a 100%, uma massa de 120mg de flavonóides totais que reagem com o reativo cloreto de alumínio. Sabe-se que a produção de metabólitos primários e secundários de um vegetal pode variar. Essa oscilação geralmente está ligada a fatores ambientais, como fertilidade do solo, umidade, radiação solar, ventos, temperatura, poluição do ar e do solo e fatores sazonais. As condições de coleta, horário e estabilização do material coletado, também podem influenciar a composição química do vegetal.<sup>6</sup> Dessa forma, o teor de flavonóides encontrado nas folhas de *B. microstachya* não é uma constante, podendo ser maior ou menor, caso coletado em diferentes épocas e regiões.

### *Ensaaios antioxidantes*

Vários são os métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais. São exemplos destes, o método do  $\beta$ -Clams, que utiliza o modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Neste, a ausência de um antioxidante faz com que ocorra a oxidação do ácido linoléico gerando radicais livres que atacam as insaturações do  $\beta$ -caroteno fazendo com que o mesmo perca sua cor laranja, característica esta que pode ser medida colorimetricamente.<sup>99</sup> O método da redução do íon  $\text{Fe}^{+3}$ , consiste na transferência de elétrons da amostra (antioxidante) para o referido íon, reduzindo-o a  $\text{Fe}^{+2}$ . Dessa forma, o poder redutor de um determinado extrato indica que nele devem existir substâncias que podem agir como antioxidantes primários e secundários.<sup>100,101</sup> Outras metodologias também podem ser encontradas, como o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA)<sup>102</sup> da oxidação do ácido linoléico<sup>82</sup> da redução do complexo fosfomolibdênico, da redução do radical livre DPPH\* entre outros.

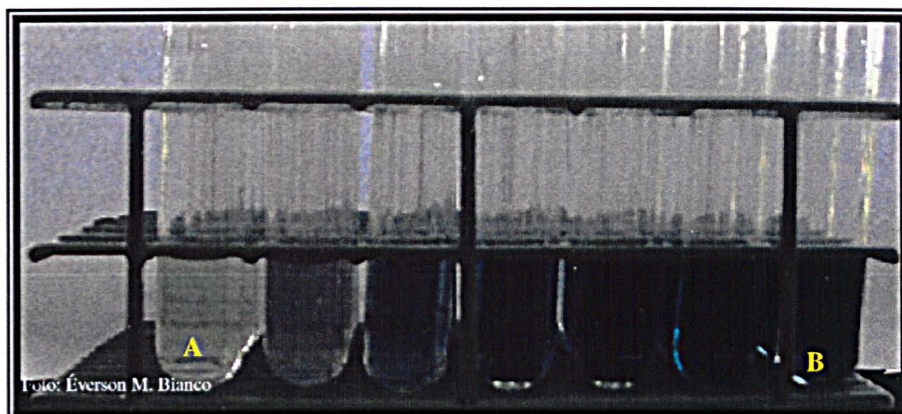
Devido a facilidade das reações, eficiência metodológica, número de citações bibliográficas e disponibilidade dos equipamentos e reagentes, no respectivo estudo, foram utilizados os dois últimos ensaios, redução do complexo fosfomolibdênico e redução do radical livre DPPH.

---

\* DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil radical livre.

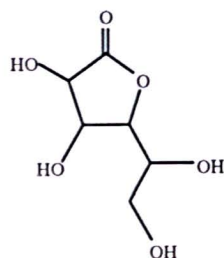
### Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico

O complexo fosfomolibdênico, formado pela reação da sol. de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (28ml, 0,1mol/l) com sol. de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (12ml, 0,03mol/l) e sol. de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (20ml, 3mol/l)\*, em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para 100ml, possui coloração amarela, tornando-se verde a medida que se reduz (Figura 10).

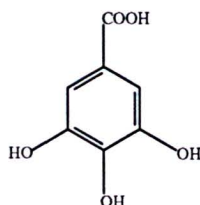


**Figura 10.** Colorações das soluções após redução do complexo fosfomolibdênico. Pouca transferência de elétrons (A) e grande transferência de elétrons (B).

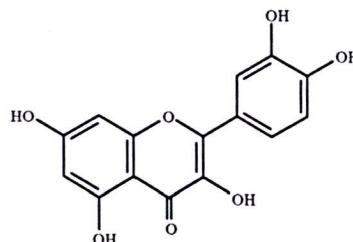
Soluções dos extratos obtidos (Tabela 6) e padrões de ácido ascórbico (LVI), ácido gálico (LVII), quercetina (LVIII), rutina (XIII) e ácido tânico\*\* (200 $\mu\text{g/ml}$ ), foram submetidas a reação de oxi-redução (90min. 100°C, n = 5) e lidas a 695nm em um espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu®. As absorvâncias das amostras foram comparadas com a absorvância dos padrões ácido ascórbico e da quercetina, substâncias descritas na literatura como antioxidantes.



(LVI)



(LVII)

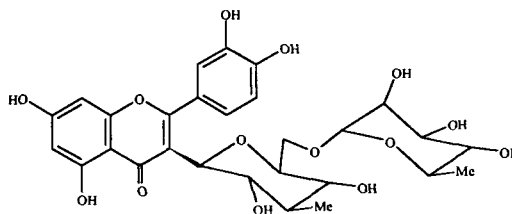


(LVIII)

\* Todos os reativos foram transferidos para um balão volumétrico e o volume foi completado para 100ml com água destilada.

\*\* Ácido tânico: sólido amorfo, não homogêneo e sem estrutura química definida, constitui-se em ésteres glicosilados do ácido gálico.<sup>71</sup>





(XIII)

Os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa ( $AAR\%_{(\text{ác. ascórbico})}$  e  $AAR\%_{(\text{quercetina})}$ ) e os cálculos estabelecidos através das seguintes equações:

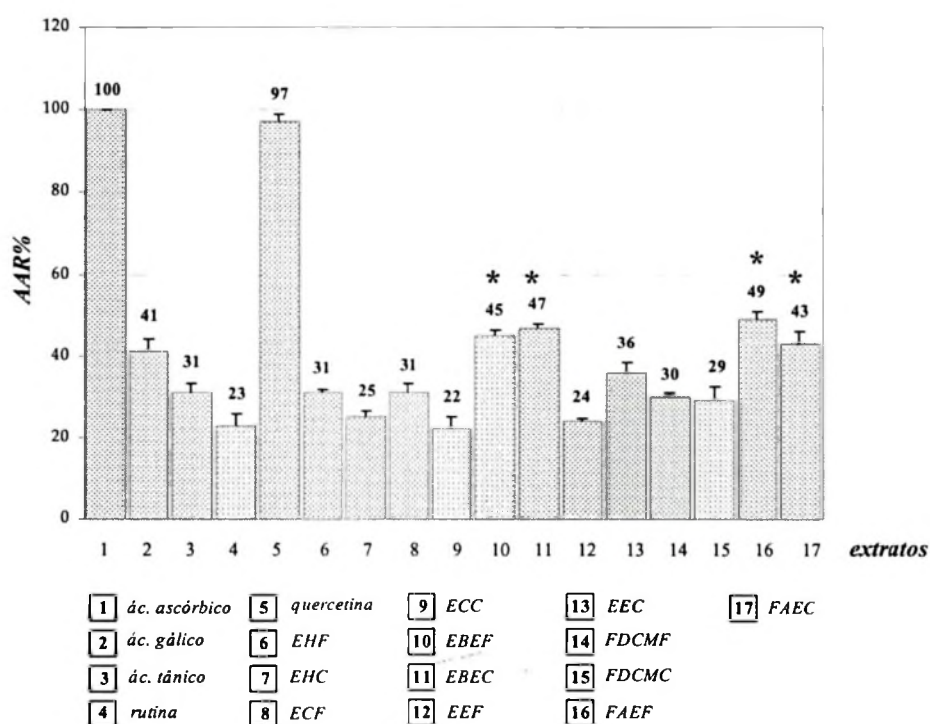
$$AAR\%_{(\text{ác. ascórbico})} = \frac{Abs_{(\text{amostra})} - Abs_{(\text{branco})}}{Abs_{(\text{ác. ascórbico})} - Abs_{(\text{branco})}} \cdot 100$$

$$AAR\%_{(\text{quercetina})} = \frac{Abs_{(\text{amostra})} - Abs_{(\text{branco})}}{Abs_{(\text{quercetina})} - Abs_{(\text{branco})}} \cdot 100$$

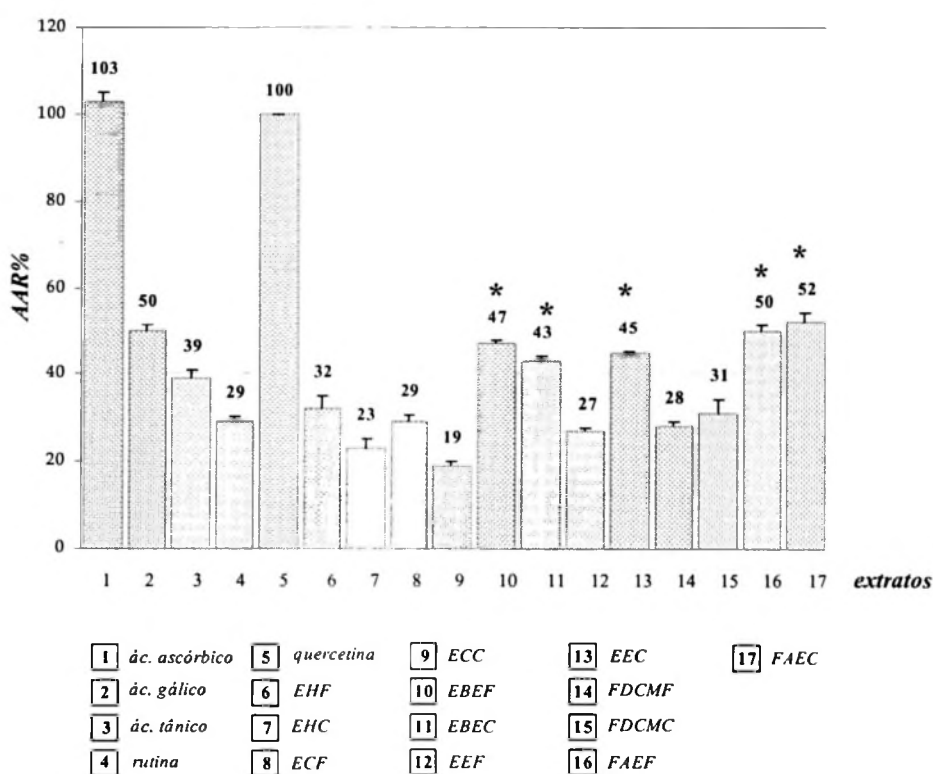
Para o extrato EHF\*, a  $AAR\%_{(\text{ác. ascórbico})}$  foi igual a  $31\% \pm 0,82$ , enquanto que para o extrato ECF,  $31\% \pm 2,1$ , para o extrato EBEF\*,  $45\% \pm 1,55$ , para o extrato EEF\*,  $24\% \pm 0,76$ , para a fração FDCMF\*,  $30\% \pm 0,87$ , para a fração FAEF\*,  $49\% \pm 2,06$ , para o extrato EHC\*,  $25\% \pm 1,43$ , para o extrato ECC\*,  $22\% \pm 3,28$ , para o extrato EBEC\*,  $47\% \pm 1,10$ , para o extrato EEC\*,  $36\% \pm 2,32$ , para a fração FDCMC\*,  $29\% \pm 3,33$  e para a fração FAEC\*,  $43\% \pm 3,14$ , em relação a 100% da total atividade atribuída ao ácido ascórbico (vitamina C).

De forma semelhante, quando esses extratos foram comparados com padrão de quercetina, a  $AAR\%_{(\text{quercetina})}$  para o extrato EHF\* foi igual a  $32\% \pm 2,87$ , enquanto que para o extrato ECF\*,  $29\% \pm 1,70$ , para o extrato EBEF\*,  $47\% \pm 0,85$ , para o extrato EEF\*,  $27\% \pm 0,83$ , para a fração FDCMF\*,  $28\% \pm 1,04$ , para a fração FAEF\*,  $50\% \pm 1,54$ , para o extrato EHC\*,  $23\% \pm 2,32$ , para o extrato ECC\*,  $19\% \pm 1,08$ , para o extrato EBEC\*,  $43\% \pm 1,31$ , para o extrato EEC\*,  $45\% \pm 0,25$ , para a fração FDCMC\*,  $31\% \pm 3,24$ , e para a fração FAEC\*,  $52\% \pm 2,25$  em relação a 100% da total atividade atribuída a quercetina (Figura 11 e 12).

\* EHF: extrato *n*-hexânico das folhas; ECF: extrato clorofórmico das folhas; EBEF: extrato bruto etanólico das folhas; EEF: extrato etanólico das folhas; FDCMF: fração diclorometano das folhas; FAEF: fração acetato de etila das folhas; EHC: extrato *n*-hexânico dos caules; ECF: extrato clorofórmico dos caules; EBEC: extrato bruto etanólico dos caules; EEC: extrato etanólico dos caules; FDCMC: fração diclorometano dos caules; FAEC: fração acetato de etila dos caules.



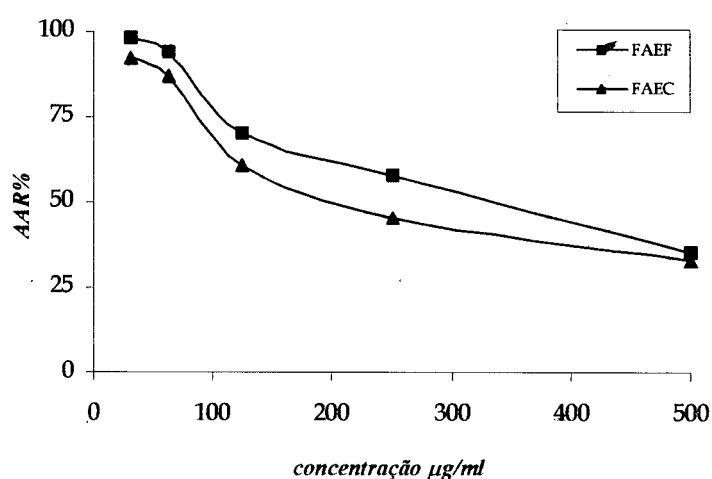
**Figura 11.** Representação gráfica da AAR% de extratos de *B. microstachya* (200 µg/ml) tendo como base a atividade do ác. ascórbico.



**Figura 12.** Representação gráfica da AAR% de extratos de *B. microstachya* (200 µg/ml) tendo como base a atividade da quercetina.

As frações FAEF e FAEC apresentaram maior AAR% tanto em relação a padrão de vitamina C quanto em relação ao padrão de quercetina. Análises fitoquímicas dessas frações evidenciaram a presença de compostos fenólicos, flavonóides e taninos, o que sugere serem os responsáveis pela alta atividade antioxidante tanto de folhas como de caules de *B. microstachya*.

A atividade antioxidante das frações FAEF e FAEC em relação ao ácido ascórbico nas concentrações de 31,25 µg/ml foram muito próximas a 100%,  $98\% \pm 1,93$  para FAEF e  $92\% \pm 2,64$  para FAEC (Figura 13). Os demais valores de AAR%<sub>(ác. ascórbico)</sub> de FAEF e FAEC estão descritos na Tabela 8.

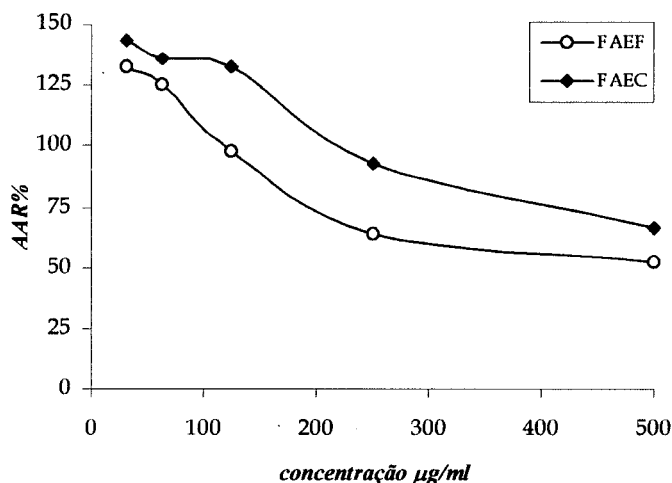


**Figura 13.** Representação gráfica da AAR% das frações FAEF e FAEC tendo como base a atividade do ác. ascórbico.

**Tabela 8.** Valores de AAR%<sub>(ác. ascórbico)</sub> para FAEF e FAEC em diferentes concentrações.

conc. (µg/ml)	FAEF	FAEC
31,25	98 ± 1,93	92 ± 2,64
62,5	94 ± 4,14	87 ± 1,82
125	70 ± 2,92	61 ± 2,58
250	58 ± 4,18	45 ± 1,72
500	35 ± 3,92	33 ± 4,13

A atividade antioxidante das frações FAEF e FAEC em relação a quercetina nas concentrações de 31,25 µg/ml foram superiores a 100%, 133%  $\pm$  3,70 para FAEF e 143%  $\pm$  2,67 para FAEC (Figura 14). Os demais valores de AAR%<sub>(quercetina)</sub> de FAEF e FAEC estão descritos na Tabela 9.



**Figura 14.** Representação gráfica da AAR% das frações FAEF e FAEC tendo como base a atividade da quercetina.

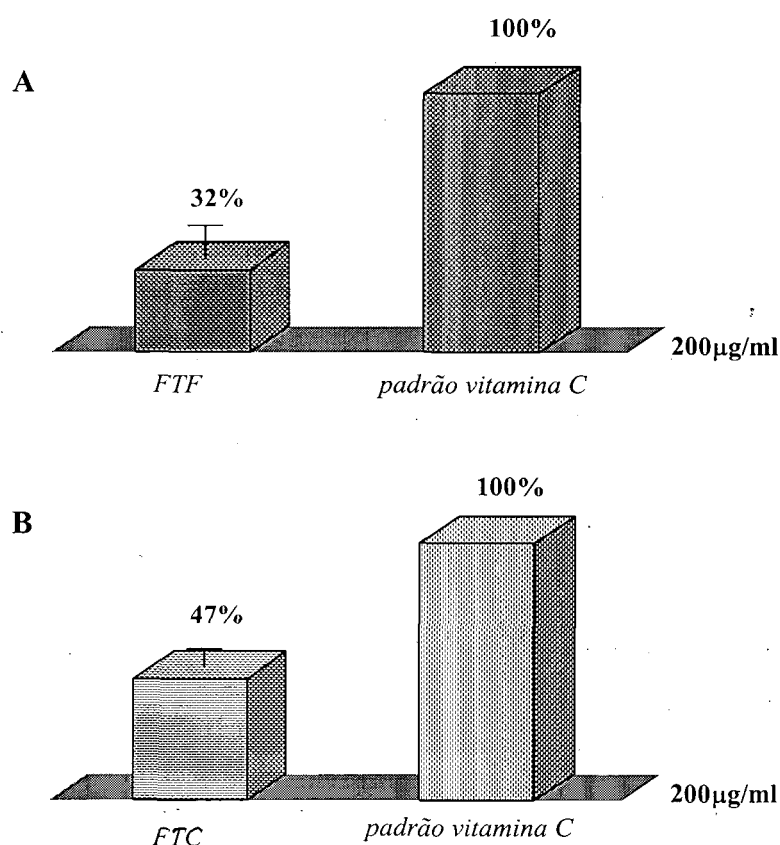
**Tabela 9.** Valores de AAR%<sub>(quercetina)</sub> para FAEF e FAEC em diferentes concentrações.

conc. (µg/ml)	FAEF	FAEC
31,25	133 ± 3,70	143 ± 2,67
62,5	125 ± 3,14	136 ± 1,06
125	98 ± 5,91	133 ± 1,82
250	64 ± 2,48	93 ± 0,92
500	52 ± 3,92	66 ± 5,52

As frações AcOEt de folhas e caules de *B. microstachya* (Raddi) Macbr. (FAEF e FAEC) apresentaram relevante atividade antioxidante quando comparadas com padrões de ácido ascórbico (vitamina C) e quercetina nas mesmas concentrações. Estudos fitoquímicos preliminares mostraram a presença de compostos fenólicos (taninos e flavonóides) nessas frações. Em concentrações de 31,25 µg/ml as atividades antioxidantes relativas em relação ao ácido ascórbico foram muito próximas a 100%, 98% para FAEF e 92% para FAEC, significando que a disponibilidade eletrônica capaz de reduzir o complexo fosfomolibdênico é equivalente a disponibilidade eletrônica do padrão de vitamina C na mesma concentração. Foi observado que a fração FAEF nas

concentrações de 31,25 e 62,5  $\mu\text{g/ml}$ , quando comparadas com padrões de quercetina nas mesmas concentrações, apresentaram-se mais ativas em 33 e 25%, respectivamente, enquanto que a fração FAEC nas concentrações de 31,25, 62,5 e 125  $\mu\text{g/ml}$ , também apresentaram-se mais ativas em 46, 36 e 33%, respectivamente, que o mesmo padrão.

As frações contendo taninos FTF e FTC\*, obtidas a partir do fracionamento em coluna preparativa\*\* das frações FAEF e FAEC respectivamente demonstraram-se moderadamente ativas quando comparadas com o padrão de ácido ascórbico (200  $\mu\text{g/ml}$ ) sendo observado para FTF e FTC uma  $\text{AAR}\%_{(\text{ác. ascórbico})}$  de  $32\% \pm 2,14$  e  $47\% \pm 1,58$  conforme mostrado na Figura 15.

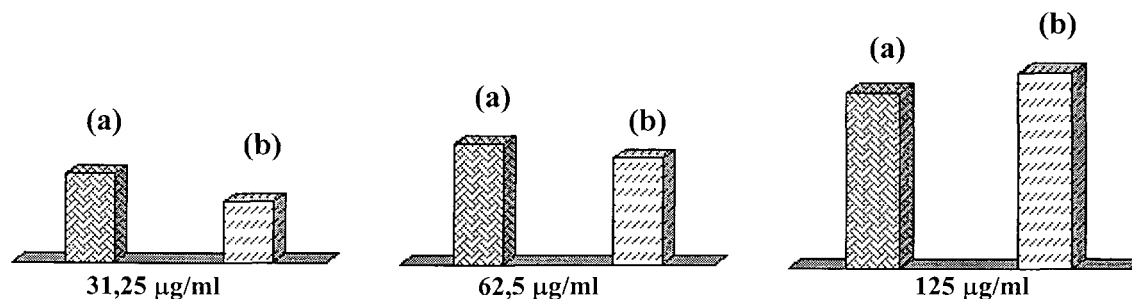


**Figura 15.** Representação gráfica da  $\text{AAR}\%_{(\text{ác. ascórbico})}$  das frações FTF (A) e FTC (B) nas concentrações de 200  $\mu\text{g/ml}$ .

\* FTF: fração de taninos obtida a partir das folhas de *B. microstachya*; FTC: fração de taninos obtida a partir dos caules de *B. microstachya*.

\*\* Maiores detalhes dos isolamentos das frações FTF e FTC estão descritos no capítulo "Experimental", pág. 90.

Pode ser observado que a atividade antioxidante das frações FAEF e FAEC aumenta de acordo com o aumento das concentrações (31,25 – 500 µg/ml), porém, as atividades antioxidantes relativas ( $AAR\%_{(ác. \text{ ascórbico})}$  e  $AAR\%_{(quercetina)}$ ) diminuem como demonstrado nas Figuras 13 e 14 e nas Tabelas 7 e 8, pois as atividades dos padrões em relação as frações aumenta em maior proporção (Figura 16).



**Figura 16.** Representação gráfica do aumento da atividade antioxidante da fração FAEF (a) e do padrão antioxidante quercetina (b), em diferentes concentrações, com consequente diminuição da  $AAR\%_{(quercetina)}$ .

Sugere-se que o decaimento observado a medida que dobra-se as concentrações das frações (FAEF e FAEC) e dos padrões (ácido ascórbico e quercetina), esteja relacionado aos constituintes não antioxidantes que integram essas duas frações, que em número, devem ser maiores aos antioxidantes. A quantidade de matéria reduzível (complexo fosfomolibdênico) é sempre constante, independente das concentração das frações e padrões utilizados. Para efeitos comparativos, a atividade antioxidante (x) de uma fração ou extrato é dividida pela atividade antioxidante de um padrão (y) numa mesma concentração, a medida que dobra-se a concentração do extrato ou fração utilizada, dobra-se a concentração do padrão e o cálculo é efetuado de acordo com a seguinte equação:

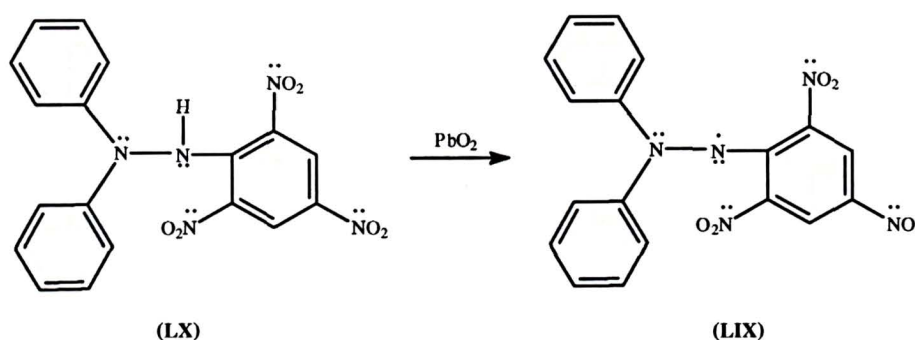
$$AAR\%_{(padrão \ y)} = \frac{Abs_{(fração \ x)} - Abs_{(branco)}}{Abs_{(padrão \ y)} - Abs_{(branco)}} \cdot 100$$

Supõe-se que ao dobrar a concentração da fração FAEF de 31,25 µg/ml para 62,5 µg/ml, dobra-se a quantidade de constituintes antioxidantes (z) presentes na amostra, dobra-se também a quantidade de constituintes não antioxidantes (w), que de certa forma, por serem em muito maior número, impedem a completa transferência de elétrons das substâncias antioxidantes para o complexo fosfomolibdênico. Dessa forma, tanto os padrões de ácido ascórbico como de quercetina, por apresentarem alto grau de pureza, não sofrem tais interferências. Conclui-se, que o método de determinação da

atividade antioxidante relativa através da redução do complexo fosfomolibdênio é eficiente, porém, sugere-se o uso de diferentes concentrações quando as amostras testadas não tratarem-se de componentes puros.

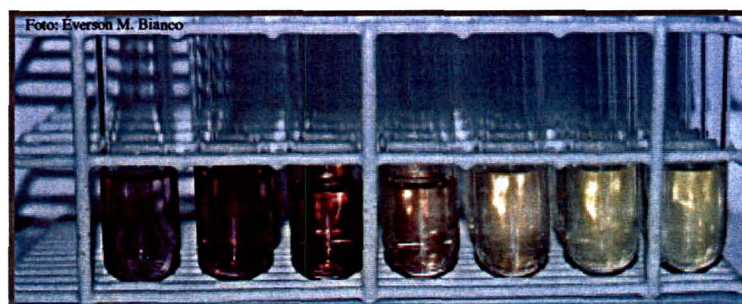
### *Ensaio da redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)*

O DPPH, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (**LIX**), é um radical livre estável na forma sólida, solúvel em solventes polares (EtOH e MeOH) e pode ser obtido através da oxidação da difenilpicrilhidrazina (**LX**), conforme Esquema 9.



**Esquema 9:** Reação de obtenção do DPPH através da oxidação da difenilpicrilhidrazina.

Possui coloração violeta escuro, que ao reduzir, descora-se, tornando-se amarelo. Numa dada concentração, quanto mais clara a solução mais antioxidante é a substância (Figura 17). Mesmo soluções extremamente diluídas ( $10^{-5}$  mol/l), podem ser medidas colorimetricamente (UV  $\lambda_{\text{EtOH}}$  518nm). Na química analítica, sol. de DPPH pode ser usada como sol. indicadora de radicais livres de um sistema, assim como, sol. de fenolftaleína pode ser usada como indicadora de íons  $\text{OH}^-$ , em sistemas alcalinos (pH 8,2).<sup>43,90,103</sup>



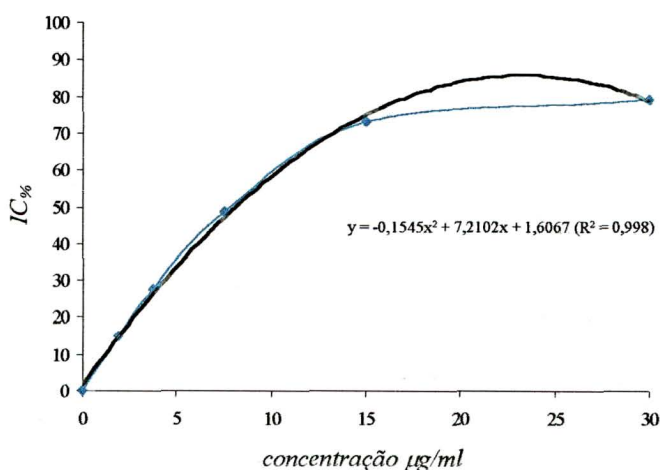
**Figura 17.** Representação de amostras mais diluídas (violetas) e mais concentradas (amarelas) em sol. de DPPH.

As frações mais ativas no ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico (FAEF e FAEC) foram testadas pelo ensaio da redução do DPPH. Foram usados como controle positivo os padrões antioxidantes quercetina (LVIII), rutina (XIII) e ácido ascórbico (LVI). A expressão dos resultados foi dada pela  $IC_{50}^*$  (em  $\mu\text{g/ml}$ ), calculada com auxílio da equação da reta interpolada com os dados de concentração (eixo da abscissas) e  $IC_{\%}$  (eixo das ordenadas). A  $IC_{\%}$  é determinada através da seguinte equação:

$$IC_{\%} = 100 - \left[ \frac{Abs_{(amostra)} - Abs_{(branco)}}{Abs_{(controle)}} \right] \cdot 100$$

#### *Determinação da $IC_{50}$ da quercetina, rutina, ácido ascórbico, FAEF e FAEC*

Quantidades de quercetina, rutina, ácido ascórbico, FAEF e FAEC foram solubilizadas em EtOH sendo obtidas sol. em diferentes concentrações (Tabela 9) que, posteriormente foram submetidas a reações com sol. de DPPH. Após o tempo de reação (30min.), as sol. foram analisadas a 518nm em um espectrofotômetro UV Vis. Com base nos valores da  $IC_{\%}$ , foram interpolados gráficos ( $IC_{\%} \times [ ] \mu\text{g/ml}$ ) e através das equações da reta fornecidas foi calculado a  $IC_{50}$ , como mostra a Figura 18, onde a rutina foi tomada como exemplo.



**Figura 18.** Representação gráfica dos valores da  $IC_{\%} \times [ ] \mu\text{g/ml}$  da rutina.

\*  $IC_{50}$ : concentração inibitória média. Concentração da amostra capaz de inibir 50% da total capacidade redutiva da sol. DPPH usada nesta metodologia (1ml e 3 mMolar).<sup>103</sup>



*Cálculo da IC<sub>50</sub> da rutina*

Pela equação fornecida pelo gráfico da Figura 16, foi estabelecido os seguintes cálculos:

$$-0,1545 x^2 + 7,2102 x + 1,6067$$

$$\frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4 \cdot a \cdot c}}{2 \cdot a}$$

$$\frac{7,2102 \pm \sqrt{22,079925}}{0,309}$$

$$\frac{7,2102 \pm 4,6989}{0,309}$$

$$x' = 8,13 \mu\text{g/ml}$$

$$x'' = 38,54 \mu\text{g/ml}$$

Dessa forma, foi determinada a IC<sub>50</sub> da rutina (8,13  $\mu\text{g/ml}$ ). A mesma base de cálculos foi aplicada para todas as demais IC<sub>50</sub> (Tabela 10).

**Tabela 10.** Determinação da IC<sub>50</sub> de padrões antioxidantes e das frações FAEF e FAEC.

Quercetina					
[ ] $\mu\text{g/ml}$	$\Sigma Abs (\lambda 518\text{nm})^{**}$	IC $_{\%}$	Equação da reta	IC $_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
0,625	0,2158	29,93	$-2,078 x^2 + 29,206 x + 8,6969$	$1,60 \pm 0,17$	
1,25	0,1653	46,33			
2,5	0,0740	75,97			
5	0,0170	94,48			
10	0,0168	94,54			
	0,3080 <sup>***</sup>	-			
Rutina					
[ ] $\mu\text{g/ml}$	$\Sigma Abs (\lambda 518\text{nm})^{**}$	IC $_{\%}$	Equação da reta	IC $_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	
1,875	0,430	14,84	$-0,1545 x^2 + 7,2102 x + 1,6067$	$8,13 \pm 0,13$	
3,75	0,3650	27,68			
7,5	0,2600	48,60			
15	0,1370	73,20			
30	0,1070	79,18			
	0,5020 <sup>***</sup>	-			

\* Ensaio feito em triplicata.

\*\* Média da:  $Abs_{(amostra)} - Abs_{(branco)}$  em triplicata.

\*\*\* Valores correspondente a Abs do controle (EtOH + sol. DPPH 0,3mM).

Tabela 10. Continuação...

Tabela 16. Continuação...

Ácido ascórbico				
[ ] $\mu\text{g/ml}$	$\Sigma \text{Abs } (\lambda 518\text{nm})^{**}$	IC%	Equação da reta	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
5	0,5800	14	$-0,0036 x^2 + 1,5883 x + 3,079$	$36 \pm 0,35$
10	0,5400	20		
20	0,4550	32,8		
30	0,3516	48		
40	0,283	58		
50	0,1683	75		
	0,6750***	-		
FAEF				
[ ] $\mu\text{g/ml}$	$\Sigma \text{Abs } (\lambda 518\text{nm})^{**}$	IC%	Equação da reta	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
0,75	0,4596	19,09	$-1,0767 x^2 + 20,254 x + 2,3153$	$2,75 \pm 0,11$
1,5	0,4016	29,27		
3	0,2496	56,53		
6	0,0990	82,65		
12	0,0553	90,74		
	0,5650***	-		
FAEC				
[ ] $\mu\text{g/ml}$	$\Sigma \text{Abs } (\lambda 518\text{nm})^{**}$	IC%	Equação da reta	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
0,25	0,5200	3,98	$-0,8661 x^2 + 20,177 x - 0,7672$	$2,86 \pm 0,004$
0,5	0,4970	8,15		
1	0,4390	18,70		
2	0,3430	36,48		
4	0,1860	66		
	0,5400***	-		

Como já demonstrado, quanto menor o valor determinado para a IC<sub>50</sub>, mais antioxidante é a substância ou o extrato testado. A partir da fração FAEF (IC<sub>50</sub> 2,75 $\mu\text{g/ml}$ ), três substâncias e uma fração foram isoladas, BM1\*, BM2, BM4 e BM3 respectivamente.

#### Determinação estrutural das substâncias BM2, BM3, BM4 e BM5

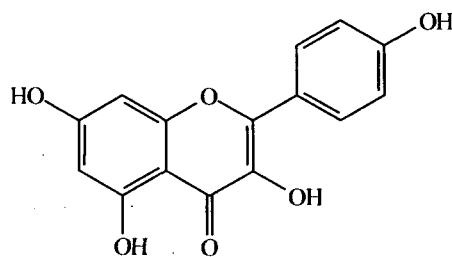
A substância BM2 apresentou-se na forma de cristais brancos e seu espectro de UV apresentou bandas em  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 226, 270 e 332 nm + NaOH 280, 329 e 394nm. O espectro de infra-vermelho de BM2 mostrou uma banda larga em  $\lambda_{\text{max}}$  3300 $\text{cm}^{-1}$ , característico de grupos hidroxilas e dois picos de tamanho médio em 1600 e 1500 $\text{cm}^{-1}$ , indicando também a presença de grupos aromáticos nesta molécula.

As melhores informações foram provenientes dos experimentos obtidos por ressonância magnética nuclear de prótons. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )

\* O composto BM1 não pode ser identificado por falta de dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ .

de BM2 (Figura 19), apresentou três singletes em  $\delta$ 13,06,  $\delta$ 10,74 e em  $\delta$ 10,25, todos com integral para um próton, o que sugere ser correspondente a grupos hidroxilas em anel aromático. O sinal  $\delta$ 13,06 sugere a presença de um grupo OH próximo de grupamento carbonila. Um par de dupletes em  $\delta$ 7,92 e  $\delta$ 6,79 (Figura 20) foram atribuídos para um grupo aromático *para*-substituído. Essas duas informações iniciais, associadas com o espectro de UV, sugerem que a substância BM2 possa ter a estrutura de um flavonóide, onde os sinais em  $\delta$ 13,06 e  $\delta$ 10,74 seriam atribuídos às hidroxilas em C-5 e C-7, respectivamente, do anel A, e os dupletes da região aromática para o anel B *para*-disubstituído. Dessa forma, o primeiro duplete ( $\delta$ 7,92,  $J$  8,98Hz) foi assinalado para os prótons em C-2' e C-6' e o segundo ( $\delta$ 6,79,  $J$  8,98Hz) aos prótons em C-3' e C-5', respectivamente. O acoplamento entre esses dois sinais pode ser claramente observado no espectro de COSY (Figura 21). O singlete em  $\delta$ 10,25 poderia ser atribuído ao grupo OH em C-4'. Os dados apresentados até agora sugerem a estrutura de um composto derivado do campferol (LXI).

Dois singletes em  $\delta$ 6,67 e  $\delta$ 6,16 restam para serem assinalados na estrutura flavônica proposta e sinais entre  $\delta$ 5 e  $\delta$ 3 mostram a presença de um possível grupamento açúcar. Se o açúcar estivesse acoplado em C-3, conforme proposto na estrutura acima, aos prótons em C-6 e C-8 seria esperado dois dupletes, com  $J$  em torno de 2Hz. De fato, prótons em C-6 e C-8 de flavonóides com o anel A disubstituído, aparecem na forma de dupletes com  $J = 2,1$ .<sup>104</sup> No entanto, o espectro da substância BM2 apresentou dois singletes, o que sugere uma possível substituição em C-3 e substituição em C-6 ou C-8, podendo-se atribuir o outro singlete para C-3.



(LXI)

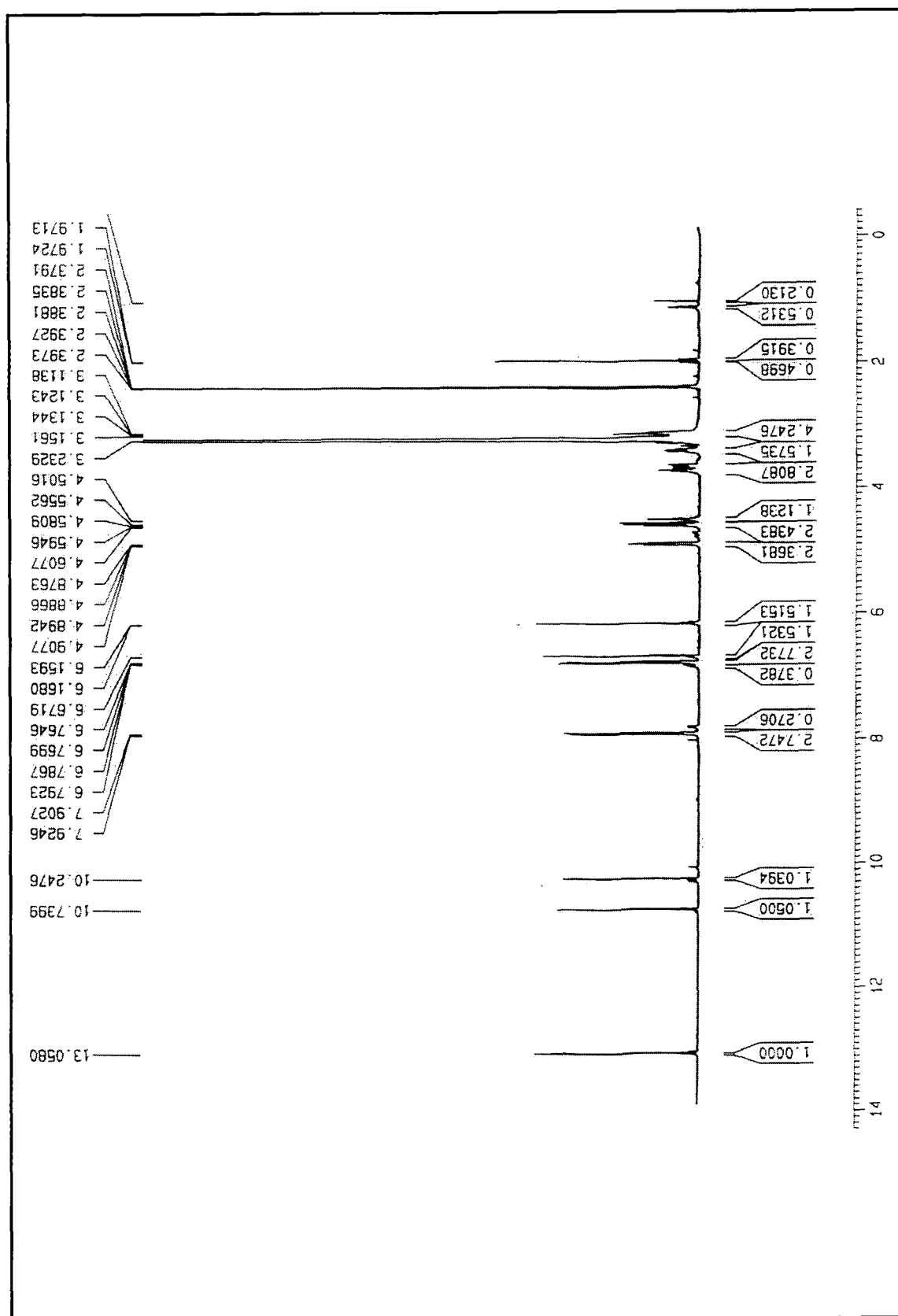


Figura 19. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) de BM2.

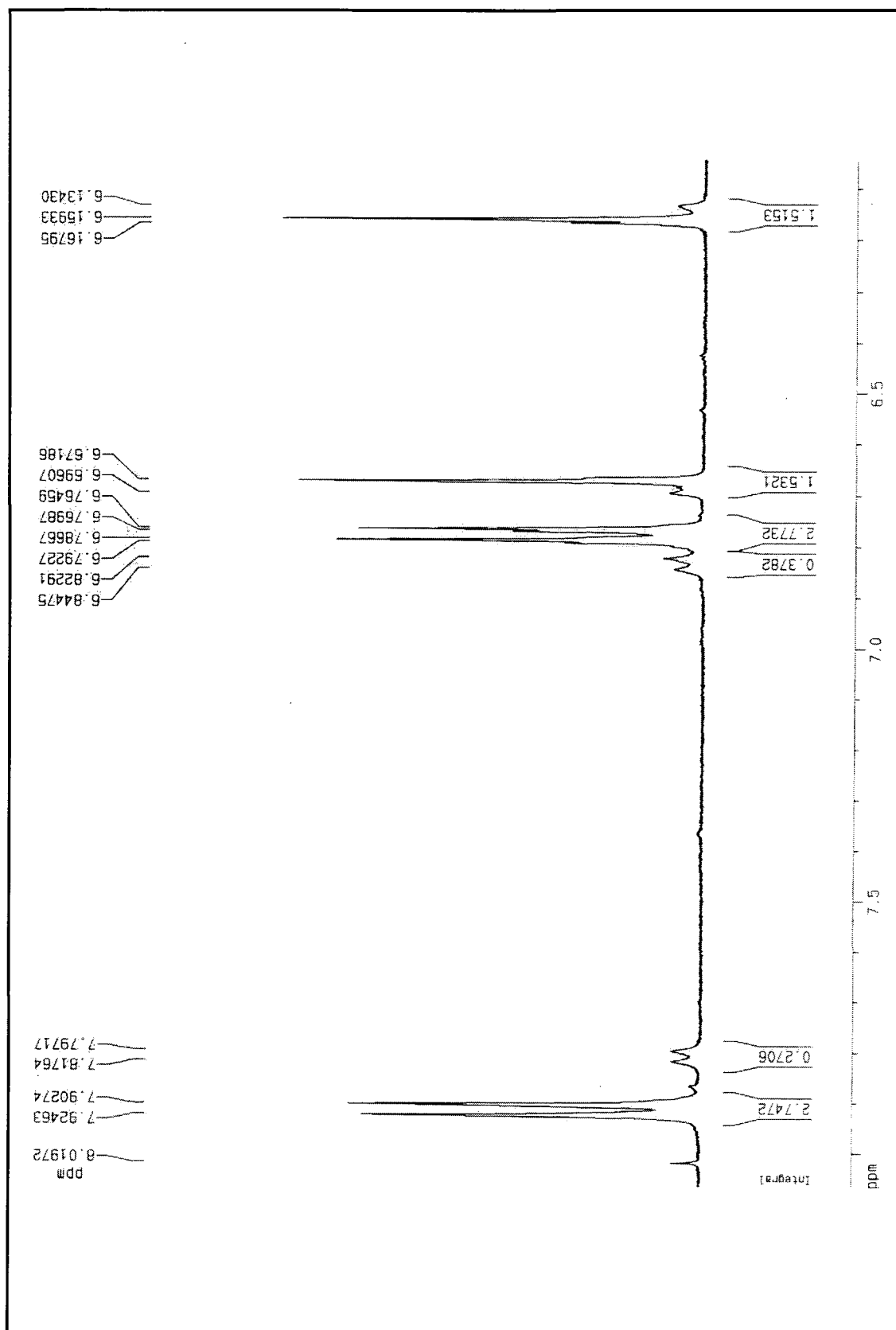


Figura 20. Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) da região aromática de BM2.

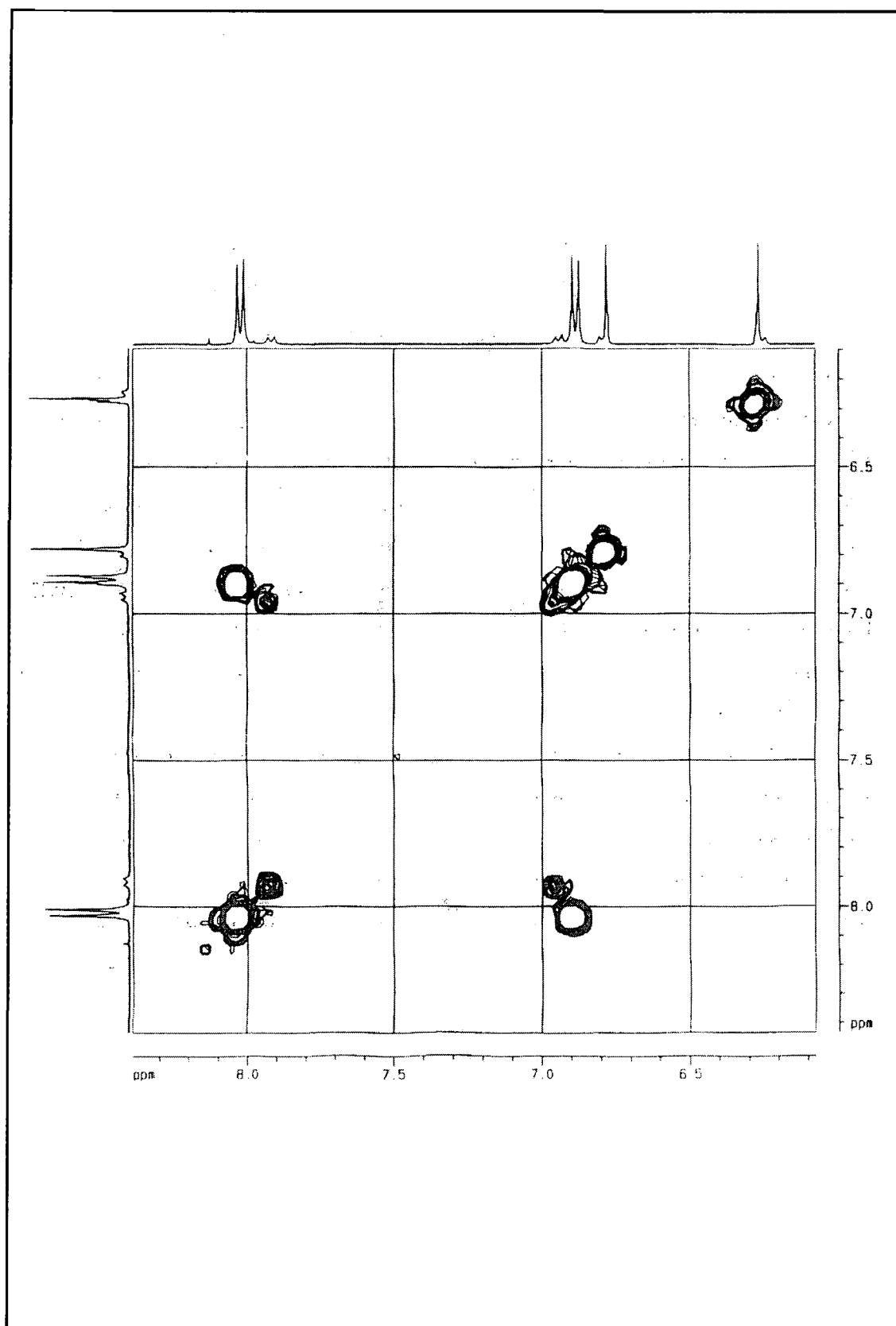


Figura 21. Espectro de COSY (400MHz, DMSO-<sub>d6</sub>) de BM2.

Os prótons desta porção açúcar puderam ser assinalados com o auxílio do espectro de COSY. Um duplete centrado em  $\delta 4,73$  (1H) com  $J$  8,9Hz, típico para acoplamento *trans*-diaxial, foi atribuído ao próton do carbono anomérico (H-1"). O espectro de COSY (Figura 22) mostra um acoplamento com o multiplete em  $\delta 3,88$  (1H,  $J$  8,9Hz), atribuído ao H-2". Para o sinal de H-2", é esperado acoplamentos *trans*-diaxial com os prótons em C-1" e C-3", como também um acoplamento a longa distância com H-4", onde é esperado um valor para  $J$  de 3-4Hz,<sup>105</sup> o que corrobora com os valores de  $J$  de 8,9 e 2,9Hz para este multiplete. Este sinal, por sua vez, apresenta um acoplamento com o multiplete em  $\delta 3,29$  (1H), assinalado para H-3". O multiplete atribuído ao H-3" apresenta correlação com um quinteto centrado em  $\delta 3,57$  (1H), o qual foi atribuído a H-4", uma vez que este apresenta uma correlação com o multiplete em  $\delta 3,81$  (1H), correspondente a H-5". Esses sinais apresentados para a porção glicosídica da molécula sugerem até então a estrutura da glucose, mas não é evidente neste espectro um sinal para H-6" metileno. Alguns sinais estranhos aparecem em  $\delta 4,65$  e  $\delta 5,06$ , cuja integral sugere mais ser devido a presença de impurezas. O sinal em  $\delta 3,39$  poderia ser atribuído aos prótons H-6", sugerindo a estrutura de glucose para essa parte da estrutura de BM2. Experimentos de HSQC e HMBC também foram realizados, mas a falta de experimentos com RMN  $^{13}\text{C}$  e espectro de massa impediram de uma melhor análise que pudesse contribuir para a elucidação desta estrutura.

Devido a falta do espectro de massa, é difícil definir se a substância BM2 trata-se de um *O*-glicosídeo ou um *C*-glicosídeo. Em caso de um *O*-glicosídeo, espera-se para H-1" um sinal acima de  $5\text{ppm}^{104}$  e, em nosso caso, o próton do carbono anomérico foi assinalado em  $\delta 4,76$ , sugerindo ser um *C*-glicosídeo. Da mesma forma, não é evidente a definição da estrutura da glucose pela falta dos prótons metilênicos H-6".

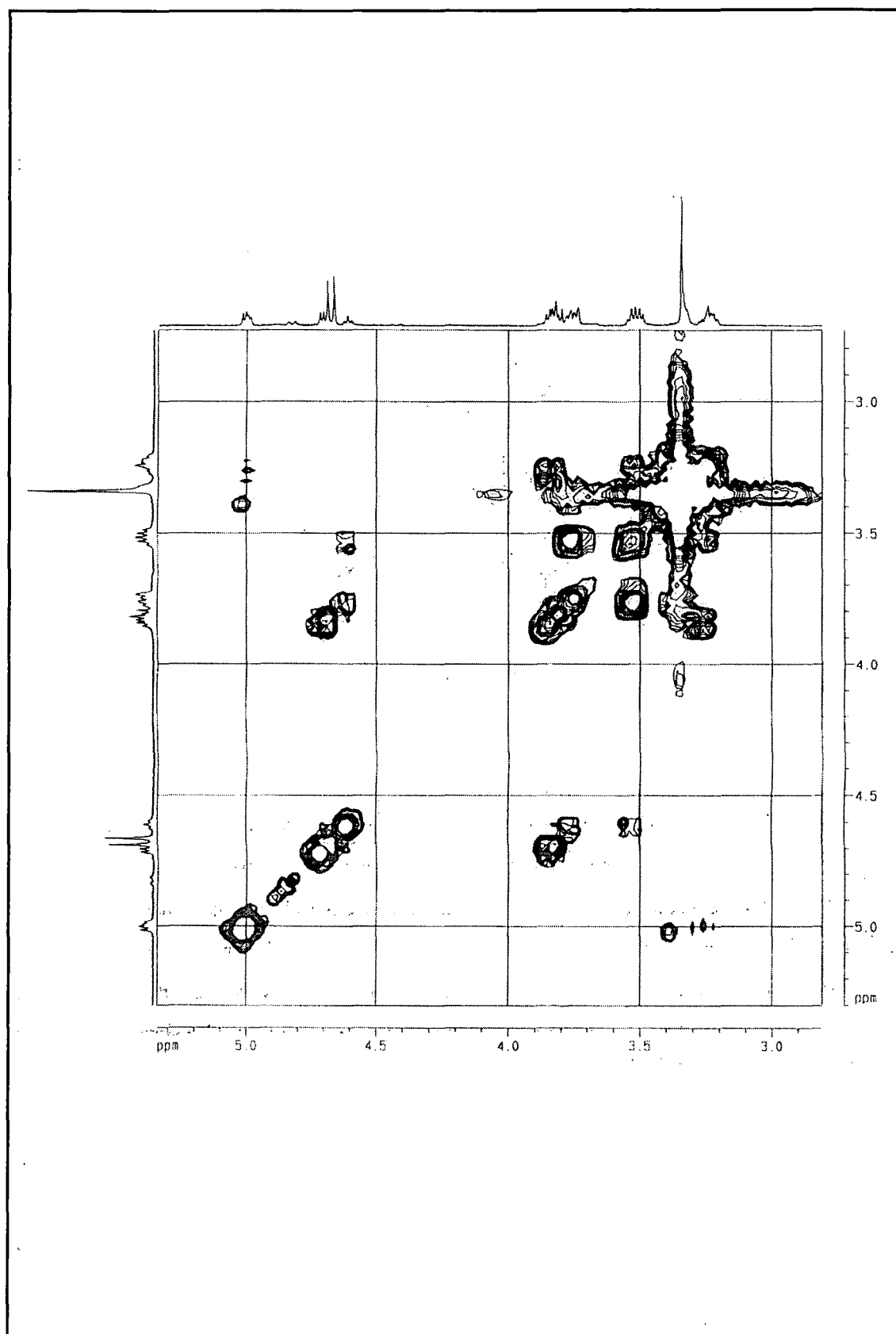
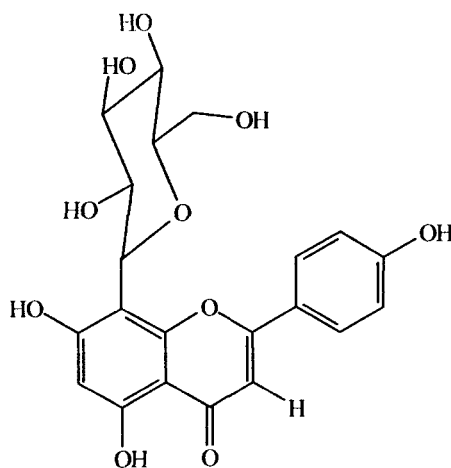


Figura 22. Espectro de COSY (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) da porção glicona de BM2.



No entanto, os dados obtidos nos sugere a possibilidade de BM2 ser o flavonóide vitexina (LXII), onde a glucose poderia estar mesmo acoplada em C-8, restando os singletes em  $\delta 6,67$  e  $\delta 6,16$  assinalados para H-6 e H-3, respectivamente. Experimentos de UV realizados com BM2 de acordo com Mabry<sup>106</sup> corroboram com esta indicação. Cechinel e colaboradores relatam a presença de 3-*O*-ramnosil-campferol em folhas de *B. microstachya*,<sup>30</sup> cuja estrutura não poderia ser para BM2 em função da falta no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de um duplete em aproximadamente  $\delta 1,6$  ppm para o grupo metil C-6" que pudesse justificar a presença de ramnose em BM2.



(LXII)

A substância designada como sendo BM3, apesar de ter apresentado apenas uma mancha em CCD, seus espectros de UV ter apresentado bandas em  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 271 e 355nm e infra-vermelho picos característicos para hidroxila, carbonila e grupo aromático, o seu espectro de RMN (400MHz, DMSO- $d_6$ ) (Figura 23) indica ser uma mistura de pelo menos três substâncias além de outras impurezas menores. A partir das expansões e do espectro de COSY de BM3 (Figura 24), foi possível assinalar a presença de pelo menos três compostos: um primeiro (A) estaria representado nos sinais em  $\delta 7,98$  e  $\delta 6,76$  ( $J$  8,8Hz), provavelmente mostrando um acoplamento *orto*-aromático. Um outro composto (B), com sinais na região aromática, pode ser observado através do set de sinais em  $\delta 7,62$ ,  $\delta 7,45$  e  $\delta 6,77$  indicando um arranjo 1,2,4 com acoplamentos *orto/meta*, os quais podem estar conectados com o par em  $\delta 6,41$  e  $\delta 6,23$ . Ainda um terceiro composto aromático (C) é possível observar em  $\delta 7,36$ ,  $\delta 7,16$  e  $\delta 7,06$ . O sinal

em  $\delta 4,2$  parece ser devido à presença de  $\text{CH}_n\text{O}$  acoplado com algo sob o sinal de  $\text{DMSO-}d_6$  e o sinal em  $\delta 1,3$ . Analisando pelo tamanho dos sinais, este fragmento poderia estar associado com os compostos B ou C. Um pequeno sinal em  $\delta 12$  poderia ser atribuído a presença de uma hidroxila aromática próxima de carbonila, mas o espectro de IV mostra apenas um pequeno sinal para  $\text{C=O}$ , o que poderia ser parte do composto A. Um espectro de massa poderia contribuir na elucidação desses compostos, mesmo sendo uma mistura, uma vez que poderia dar uma idéia do tipo de compostos presentes.

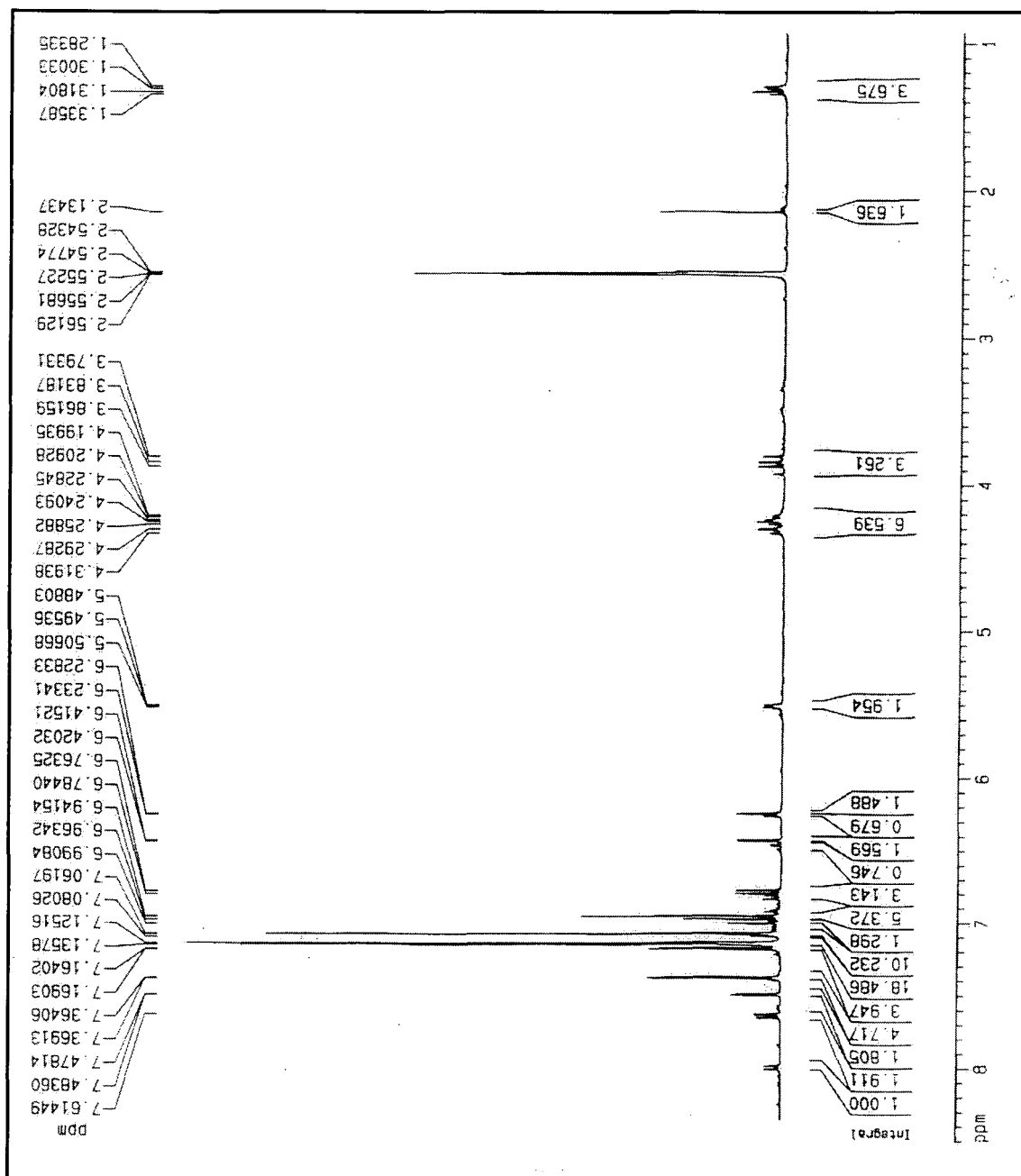


Figura 23. Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de BM3.

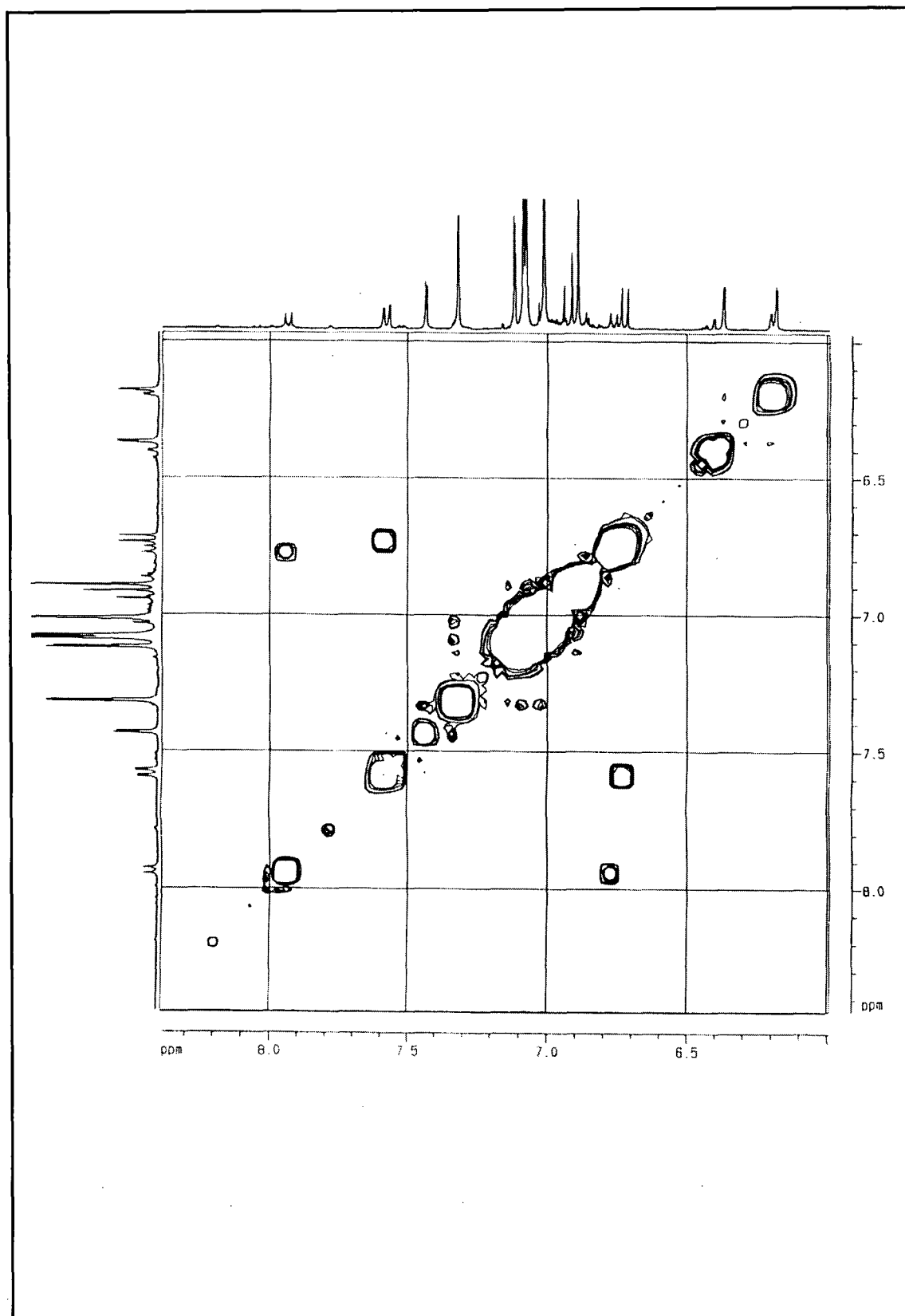
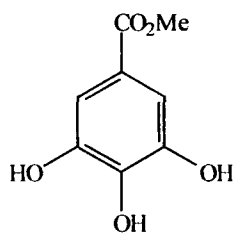
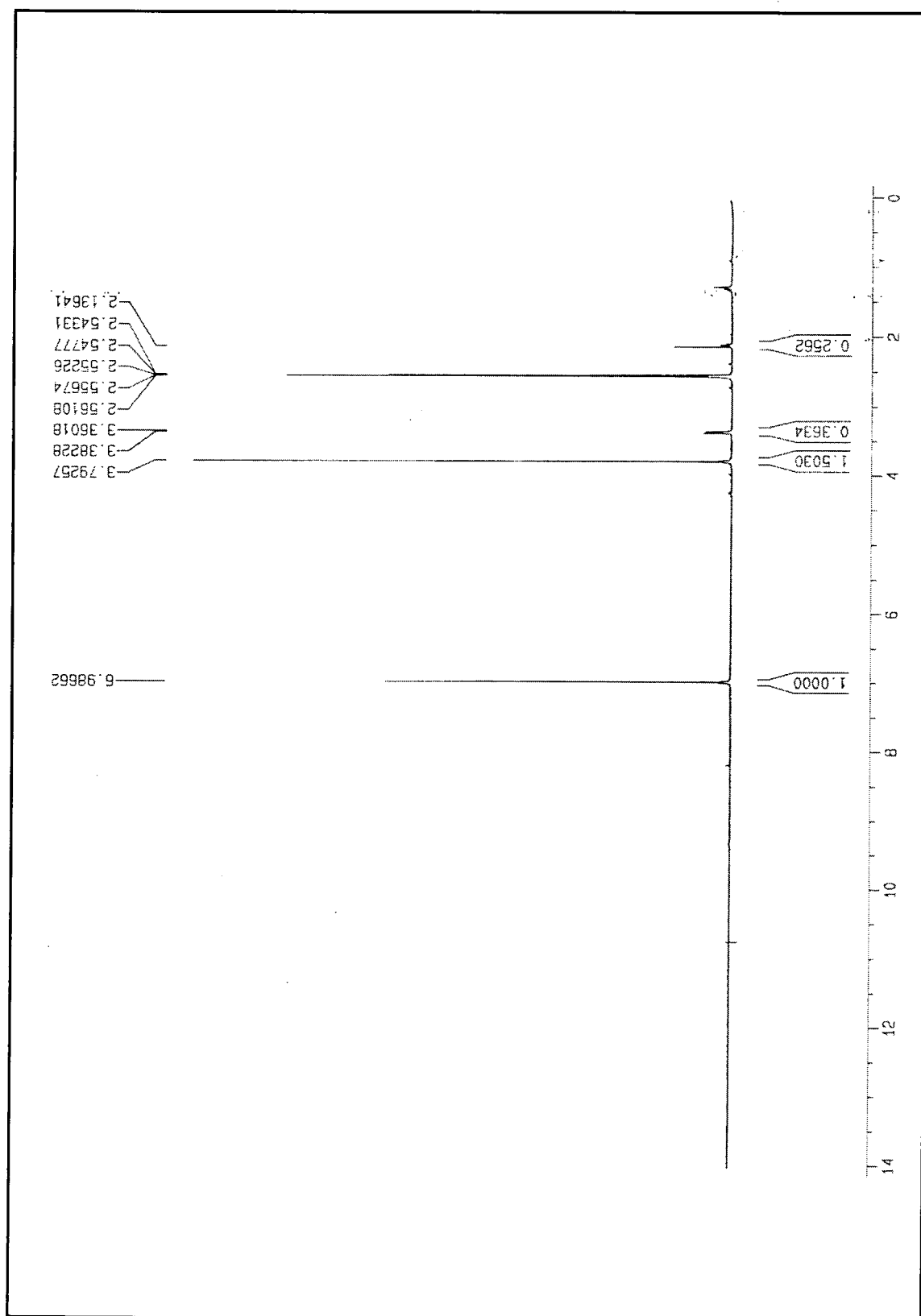


Figura 24. Espectro de COSY (400MHz, DMSO- $d_6$ ) de BM3.

Além dessas três possíveis substâncias, pode-se observar também nesta mistura denominada de BM3, a presença de pequena quantidade da substância BM4, cujo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) (Figura 25) apresentou apenas dois singletes em  $\delta 3,79$  e  $\delta 6,98$ . O espectro de UV de BM4 apresentou bandas em  $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH})$  273 e 302nm, mostrando a presença de um cromóforo aromático neste composto. O sinal em  $\delta 3,79$  pode ser atribuído para grupos  $-\text{OCH}_3$  em ésteres metílicos ou ligados a anel aromático. Esse sinal, com integral 1,5, quando comparado com o singlete em  $\delta 6,98$  com integral de 1,0, indica a presença de dois prótons simétricos em anel aromático, sugerindo ser BM4 o composto galato de metila (XXXV), também já isolado nesta espécie.<sup>30</sup>



(XXXV)



**Figura 25.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) de BM4.

Devido ao baixo rendimento dos isolados, apenas a fração BM3 ( $IC_{50}$  7,13 $\mu$ g/ml) e a substância BM5 ( $IC_{50}$  29,2 $\mu$ g/ml) puderam ser quantificados quanto a atividade antioxidante (redução do DPPH). Quando comparados com padrão de quercetina ( $IC_{50}$  1,6 $\mu$ g/ml) BM3 e BM4 demonstraram-se menos antioxidantes, porém, quando comparados com padrão de rutina ( $IC_{50}$  8,13 $\mu$ g/ml), BM3 demonstrou-se mais antioxidante, da mesma forma que BM3 e BM4 apresentaram-se mais antioxidantes que o padrão de ácido ascórbico utilizado. Também foi verificado que BM3 e BM4 apresentaram-se menos ativos que a fração FAEF de onde foram isolados, o que se sugere a existência de um possível efeito sinérgico antioxidante entre os componentes que a integram (Tabela 11).

**Tabela 11.** Determinação da  $IC_{50}$  de BM3 e BM4.

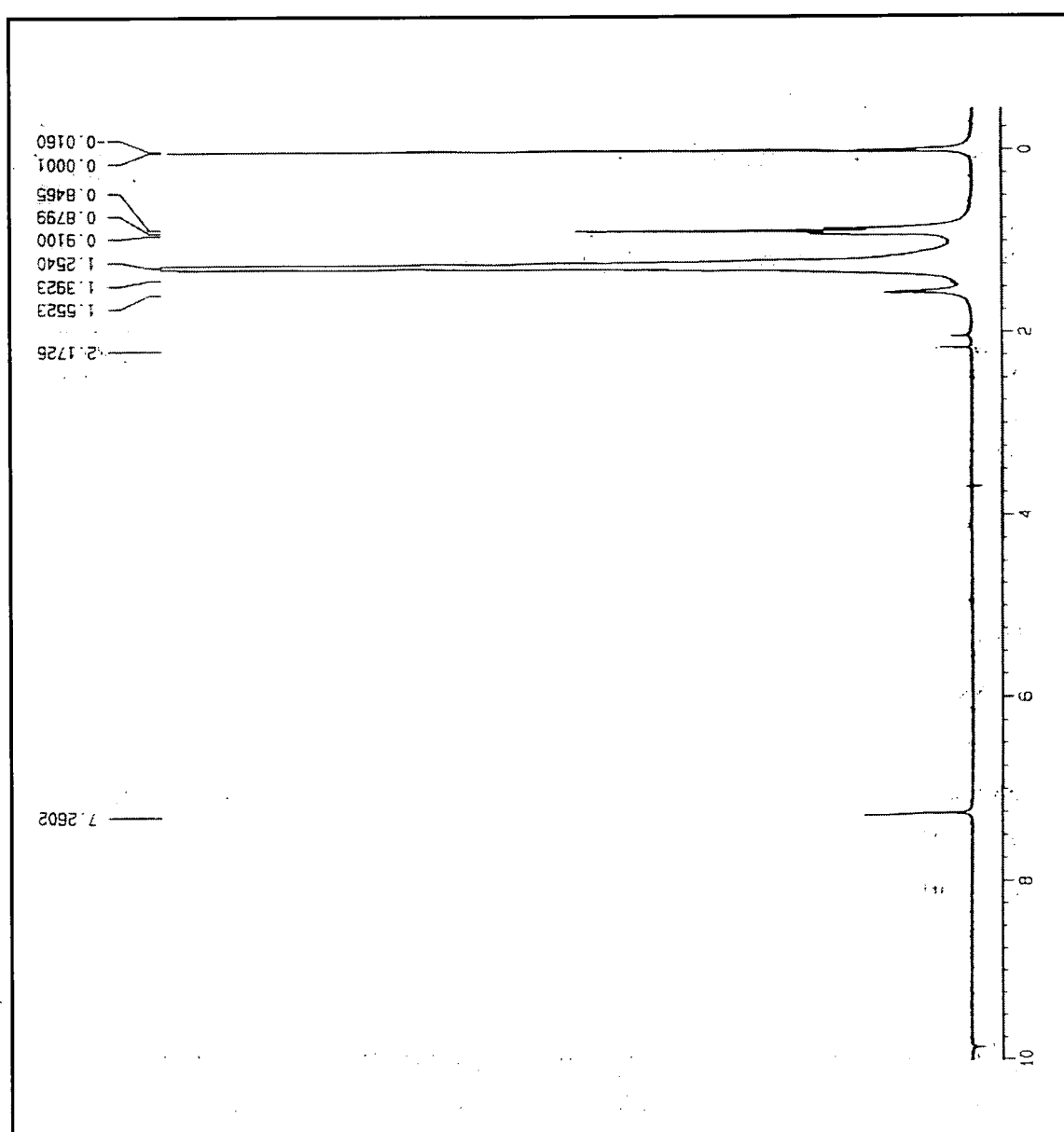
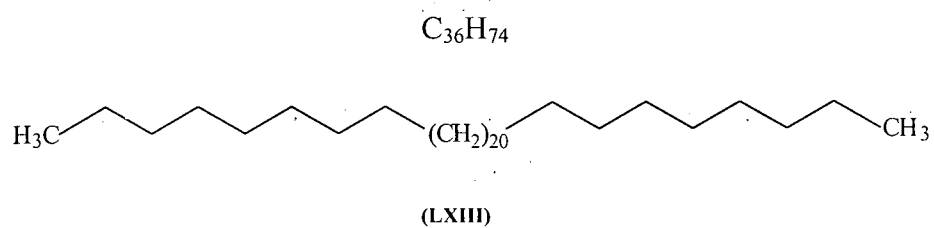
Tabela 11. Determinação da IC <sub>50</sub> de BM3 e BM4.					
BM3					
[ ] µg/ml	Σ Abs (λ518nm)**	IC%	Equação da reta	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
5	0,3333	43,56	-0,1707 x <sup>2</sup> + 7,5172 x + 5,0619	7,13 ± 0,08	
10	0,1850	68,64			
20	0,1270	78,42			
30	0,1175	80,08			
	0,5900***	-			
BM4					
[ ] µg/ml	Σ Abs (λ518nm)*	IC%	Equação da reta	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
8	0,0506	7,34	-0,002 x <sup>2</sup> + 1,7273 x - 2,1527	29,20 ± 0,12	
12	0,4590	15,77			
16	0,3690	32,23			
32	0,2540	54,31			
	0,5450***	-			

A substância BM5, p.f. 64-65°C, apresentou espectro de RMN  $^1H$  (200MHz,  $CDCl_3$ ) (Figura 26) com apenas dois picos: um singlete largo em  $\delta$ 1,25 e um triplete em  $\delta$ 0,88. Esse composto, quando analisado por CG-EM mostrou 100% de um único pico em CG, cujo espectro de massa (Figura 27) apresentou  $M^+$  506, com fragmentação característica de perda de massa de  $m/z$  14 e picos principais em  $m/z$  43, 57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155, 169, 183, 197. A análise desses dados sugere a estrutura de um hidrocarboneto de cadeia longa de  $C_{36}H_{74}$  referente ao hexatriacontano (LXIII).

\* Os ensaios para a determinação da  $IC_{50}$  do composto BM2 e BM4 e da fração BM3 foram feitos em duplicata.

\*\* Média da  $Abs_{(amostra)} - Abs_{(branco)}$  em duplicata.

\*\*\* Valores correspondente a Abs do controle (EtOH + sol. DPPH 0,3mM).



**Figura 26.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de BM5.

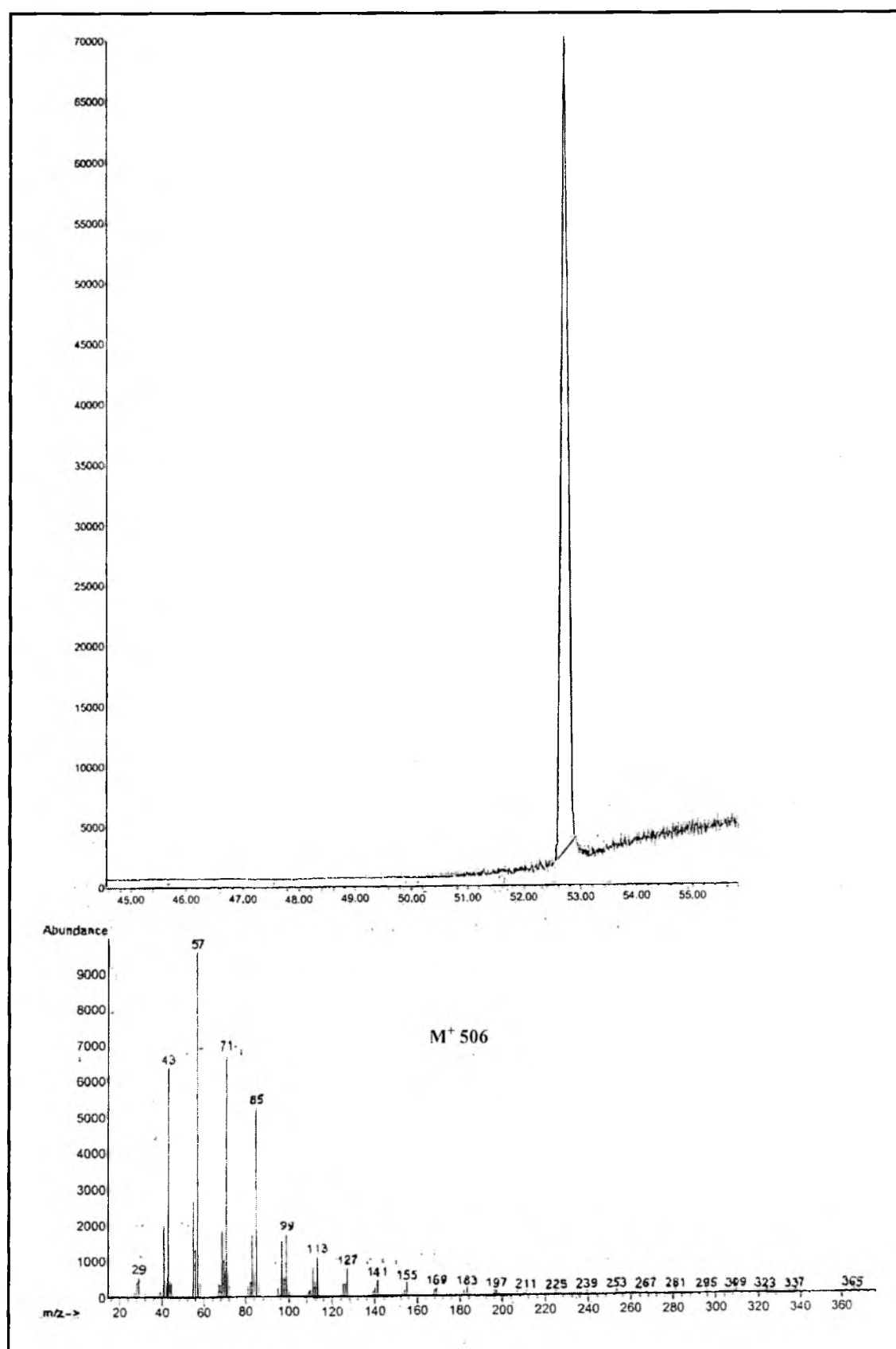


Figura 27. Cromatograma (CG-EM) e espectro de massa de BM5.

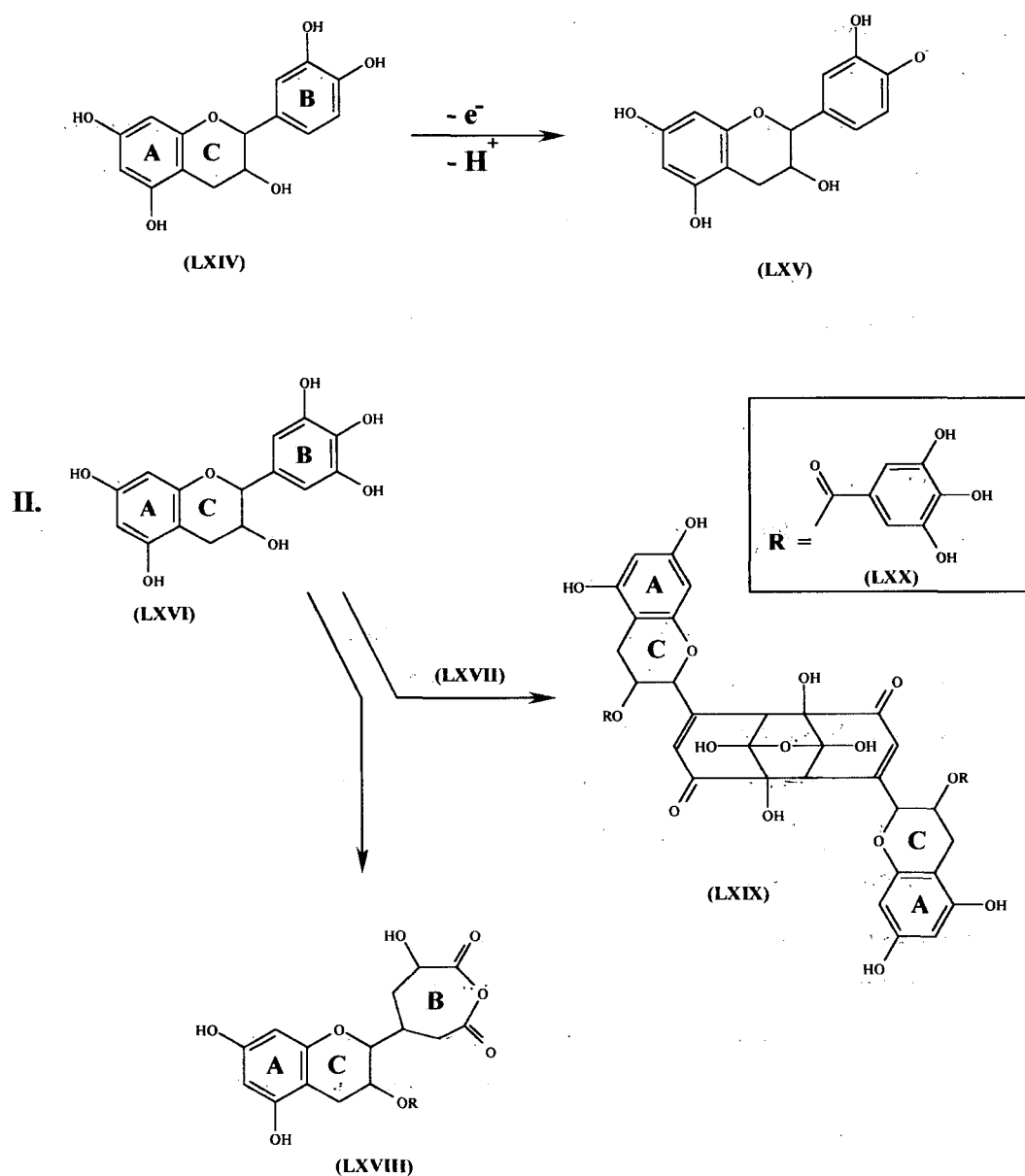


BM6 e BM7 não puderam ser identificados por falta de dados espectrofotométricos, mas o espectro de RNM  $^1\text{H}$  (200MHz, DMSO- $d_6$ ) de BM7 indica uma provável estrutura de composto esteroideal ou triterpênico, não glicosilado, devido ao grande número de sinais entre  $\delta 2,2\text{--}0,9$ . Um sinal em  $\delta 3,60$  poderia indicar a presença de uma hidroxila em C-3 do núcleo esteroideal, em conjunto com o triplete que aparece em  $\delta 2,26$ , poderia ser atribuído um próton em C-7, indicando uma dupla ligação em C-5, fragmento comum em diversos compostos esteroideais.

Além de flavonóides, testes fitoquímicos demonstraram a existência de taninos hidrolisáveis e condensados na fração FAEF. O grande número de substituições hidroxilas ( $\text{R} = \text{OH}$ ) nos anéis A e B (Figura 2) dessas moléculas podem estar ligados a intensa atividade antioxidante das frações FAEF e FAEC como demonstram Siddhuraју e Zhishen.<sup>107,108</sup> Dessa forma, as frações FAEF e FAEC de *B. microstachya*, podem ser usadas como *scavengers* de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{HO}^{\cdot}$  e outras ERO.

Estudos realizados por Braca,<sup>43</sup> demonstraram o isolamento de cinco compostos fenólicos; uma cetona e um ácido indol-carboxílico das folhas de *B. tarapotensis*, espécie sul americana conhecida popularmente pelo nome genérico pata-de-vaca. O extrato MeOH desta espécie apresentou atividade antioxidante significativa pelo método da redução do DPPH ( $\text{IC}_{50}$   $19\mu\text{g/ml}$ ), da mesma forma que os extratos e as frações mais polares (EBEF, EBEC, FAEF e FAEC) de *B. microstachya* também demonstraram alta atividade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico e do DPPH. Dos constituintes isolados a partir das folhas de *B. tarapotensis*, o composto polifenólico isoacteosídeo (LV) foi o que apresentou maior atividade antioxidante pelo método da redução do DPPH ( $1,3\text{mM}$ ). Comparativamente, o extrato MeOH de *B. tarapotensis*, revelou possuir maior atividade que o padrão de ácido ascórbico ( $\text{IC}_{50}$   $36\mu\text{g/ml}$ ), antioxidante clássico descrito pela literatura, porém, esse extrato demonstrou-se menos ativo quando comparado com as frações FAEF e FAEC de *B. microstachya* ( $\text{IC}_{50}$   $2,75$  e  $2,86\mu\text{g/ml}$ , respectivamente).<sup>43,108</sup> Sugere-se que outros componentes além dos isolados da fração FAEF estejam envolvidos nesta atividade, uma vez que, quando purificados, apresentaram menor atividade que a fração de onde saíram. A presença de galato de metila (XXXV), campferol-3-*O*-ramnosil (XXXVI), quercetina-3-*O*-ramnosil (XXXVII) e mirecitina (XXXVIII), compostos isolados por Meyre-Silva<sup>30</sup> das folhas de *B. microstachya* também podem estar relacionados a esta intensa atividade antioxidante.<sup>30</sup>

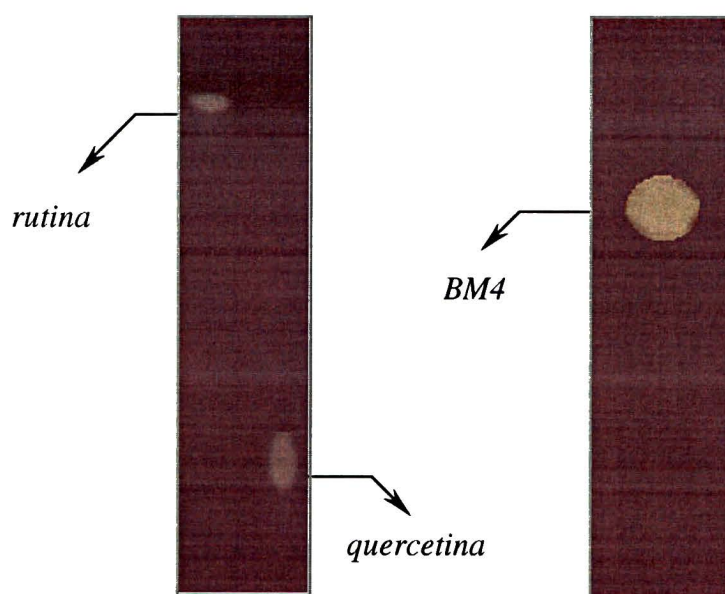
Finalizando, a atividade antioxidante de folhas e caules de *B. microstachya* em parte está associada a presença de compostos fenólicos (flavonóides e taninos). O mecanismo que relaciona a estrutura-atividade dos flavonóides em relação ao seus potenciais antioxidantes pode ser observado no Esquema 3, onde a reação de um flavonóide com um radical alquil ( $R^\bullet$ ) produz um flavonóide radical, chamado genericamente de aroxil, que, devido o tamanho de seus grupos fenilas, radicais hidroxilas e estruturas de ressonância, estabiliza-se em quinonas, terminando as reações de cadeia. Dessa forma, radicais aroxis são espécies pouco deletérias em relação as demais espécie radicalares geradas pelo metabolismo.<sup>72,82,109</sup> O mecanismo que relaciona a estrutura-atividade dos taninos condensados ou catéquicos (protoantocianidinas) em relação ao seus potenciais antioxidantes é explicado por Valcic e colaboradores, citado por Paré,<sup>83</sup> que examinou os constituintes polifenólicos majoritários do chá verde (*Camellia sinensis*). Em seu estudo, é demonstrado os produtos da simples oxidação de um elétron de uma catequina genérica (LXIV) com formação de um radical catequina-fenóxil (LXV) fundamental para a atividade antioxidante. Neste estudo, também é demonstrado os produtos de oxidação do galato de (-)-galocatequina (LXVI) quando a reação é inicializada pelo radical peroxil 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitrila) (LXVII). Como produto de reação, é observado uma estrutura formada por um anel anidrido de sete membros (LXVIII), bem como, uma segunda estrutura formada por um sistema (1,4) hidroxilado, (1-4) oxigenado unidos em um anel dímero do galato de (-)-galocatequina (LXIX). Sugere-se que a atividade antioxidante desse componente, conseqüentemente dos taninos catéquicos, pode estar relacionada aos grupamentos trihidroxifenil (LXX) do anel B conforme mostra o esquema (Esquema 9).<sup>83</sup>



**Esquema 9.** Compostos fenólicos e o mecanismo antioxidante. Radical catequina-fenoxil formado pela oxidação de um elétron (I). Produtos da oxidação do galato de (-)-galocatequina inicializado pelo radical 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitrila) (II).

### *Determinação qualitativa por CCD da atividade antioxidante de um composto isolado*

Os produtos BM2, BM3, BM4 e BM5 foram submetidos a cromatografia em camada delgada e revelados com solução de vanilina- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , anisaldeído- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Np/PEG onde apresentaram apenas uma mancha. Quando tais componentes foram revelados com sol. de DPPH (0,2%), manchas amarelas puderam ser observadas em BM2, BM3 e BM4 revelando atividade antioxidante. Padrões antioxidantes de rutina e quercetina foram usados como comparativos. O aparecimento das manchas amarelas deve-se ao fato de que o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) quando em contato com substâncias de alto potencial de oxidação (antioxidantes), reduz, mudando sua coloração de violeta para o amarelo (Figura 28).<sup>102,110</sup>



**Figura 28.** CCD de quercetina, rutina e BM4 (fm: AcOEt-AcOH- $\text{CO}_2\text{H}_2$ - $\text{H}_2\text{O}$  (100:5:5:13) reveladas com sol. DPPH (0,2%).

### Ensaio antimicrobiano

Constituintes polifenólicos, flavonóides, taninos, ésteres fenólicos simples entre outros, podem desempenhar importantes atividades antimicrobianas, é o caso da quercetina, rutina, apigenina,<sup>111</sup> remangiflavanonas A e B<sup>112</sup> frente a cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Estudos fitoquímicos revelaram a presença desses constituintes nas folhas e nos caules de *Bauhinia microstachya*, dessa forma, extratos brutos das folhas e dos caules (EBEF e EBEC), bem como as frações acetato de etila das folhas e dos caules (FAEF e FAEC) foram testadas visando uma possível atividade.

Testes antimicrobianos realizados por Savi<sup>63</sup> com folhas de *Bauhinia splendens*, espécie semelhante a *B. microstachya*, de nome comum cipó-escada, revelaram atividade tanto contra bactérias Gram positivas quanto Gram negativas. Naquele estudo, utilizando o método da difusão em ágar, foi verificado para o extrato DCM um halo médio de inibição de 26mm frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e 18mm frente a cepas de *Streptococcus* sp. (2,5mg/disco). Os extratos DCM e AcOEt demonstraram-se ativos contra cepas de *Salmonella* sp. em todas as concentrações utilizadas (1,25-3,75mg). Em relação a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), o extrato DCM apresentou valores de 0,7mg/ml contra *S. typhimurium* e 0,4mg/ml, contra *S. aureus*. Já extrato AF, para os mesmos microorganismos, apresentou MIC de 0,8mg/ml e 0,4mg/ml respectivamente.

Souza e colaboradores, demonstraram ausência de atividade antimicrobiana frente a cepas de *E. coli* e *S. aureus* (método da difusão em ágar) para a espécie *B. microstachya* coleta na região de Urussunga, Estado de Santa Catarina.<sup>64</sup>

Ensaio realizado em extratos de folhas e caules de *B. microstachya* (EBEF, EBEC, FAEF e FAEC), nas concentrações de 62,5, 125, 250, 500 e 1000µg/disco confirmaram a ausência de atividade antimicrobiana no ensaio da difusão em ágar frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. No ensaio da diluição em ágar os extratos EBEF e EBEC (5.000µg/placa) e os extratos FAEF e FAEC (1.000µg/placa) também apresentaram-se inativos frente estas mesmas cepas. Como controle positivo, foi utilizado no ensaio da difusão em ágar o antibiótico cloranfenicol (10µg/disco) onde foi observado ao redor dos discos halos médio de inibição próximos a 25mm (Figura 29 e 30).

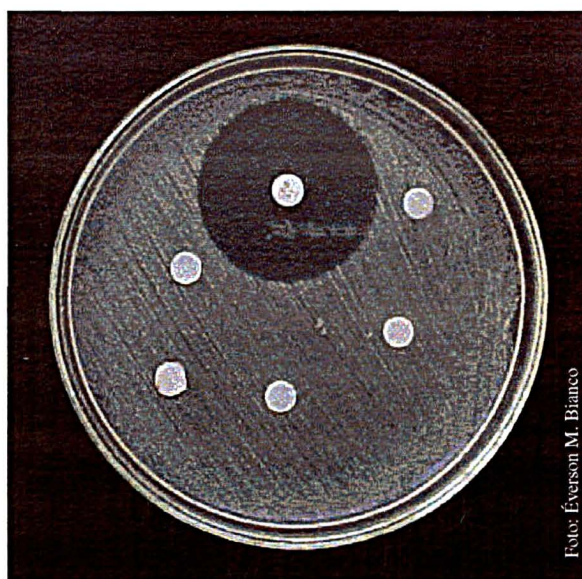


Foto: Everson M. Bianco

**Figura 29.** Ensaio de atividade antimicrobiana (difusão em ágar) após incubação (37°C e 24h) utilizando a fração FAEF nas concentrações de 62,5µg/disco, 125µg/disco, 250µg/disco, 500µg/disco e 1000µg/disco frente ao *Staphylococcus aureus*.

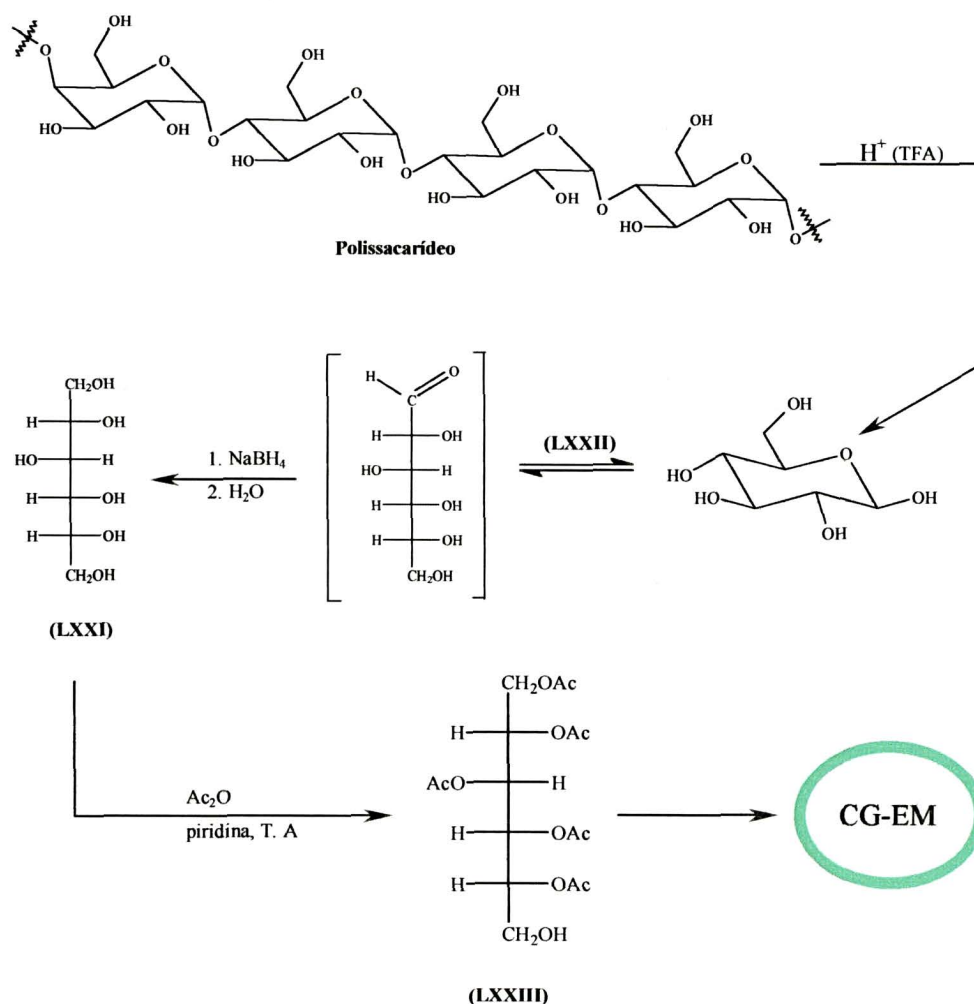


Foto: Everson M. Bianco

**Figura 30.** Ensaio de atividade antimicrobiana (diluição em ágar) após incubação (37°C e 24h) utilizando o extrato EBEF na concentração de 5.000µg/placa frente ao *Staphylococcus aureus*.

### Monossacarídeos encontrados nas folhas de *B. microstachya*

As frações obtidas\* (Esquema 8) após neutralizadas, dialisadas e hidrolisadas, foram convertidas a ésteres, derivados mais fáceis de manipular que na forma de açúcares livres. O maior número de grupos hidroxilas nas estruturas os tornam mais voláteis, solúveis em solventes orgânicos, cristalizam-se com maior facilidade e dificilmente formam o aspecto xaroposo quando a água é removida. As frações polissacarídicas (Esquema 8) foram hidrolizadas com TFA (100°C, 5h) e reduzidas com NaBH<sub>4</sub> (2h, 25°C) dando poliálcoois chamados de alditóis (**LXXI**). A redução ocorre na forma aberta presente no equilíbrio entre o aldeído ou a cetona e seu respectivo hemiacetal (**LXXII**), conforme Esquema 10.



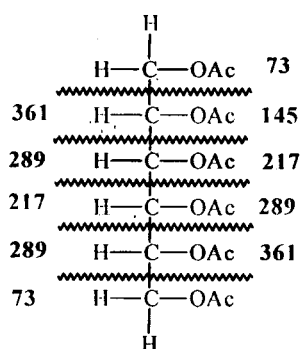
**Esquema 11.** Etapas para a identificação dos monossacarídeos das folhas de *B. microstachya*.

\* As frações obtidas (Esquema 8), foram chamadas de frações polissacarídicas, porém, não foi confirmado neste estudo a existência dos mesmos. Há portanto, a necessidade novos estudos (RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C) para a comprovação.

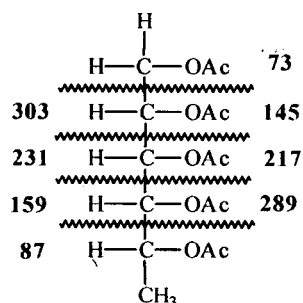


Embora a percentagem seja pequena no equilíbrio, a forma aberta é reduzida, e para estabelecer o equilíbrio ocorre abertura da forma piranose. A nova porção na forma aberta também é reduzida, e o processo se repete, até que toda amostra tenha reagido. A esterificação foi efetuada com  $\text{Ac}_2\text{O}$  e piridina. Todos os grupos hidroxilas, inclusive o anomérico reagem. Por fim, os acetatos de alditóis formados (LXXIII) foram extraídos com  $\text{CHCl}_3$ , secos e analisados em CG-EM. Os fragmentos e os tempos de retenção ( $\text{Tr}_{(\text{min.})}$ ) dos derivados obtidos foram comparados com padrões de acetatos de alditóis de ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose (Figura 19).<sup>113</sup>

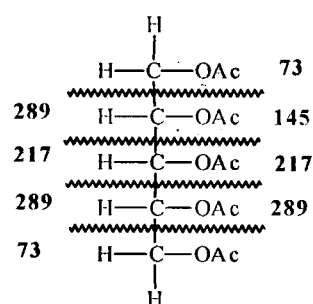
*Fragmentação primária dos principais acetatos de alditóis*



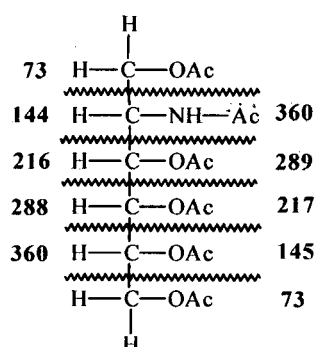
Hexitol hexacetato  
(Man, Gal, Glu, Fru)



Deoxi-hexitol hexacetato  
(Ram, Fuc)



Pentitol pentacetato  
(Rib, Ara, Xil)



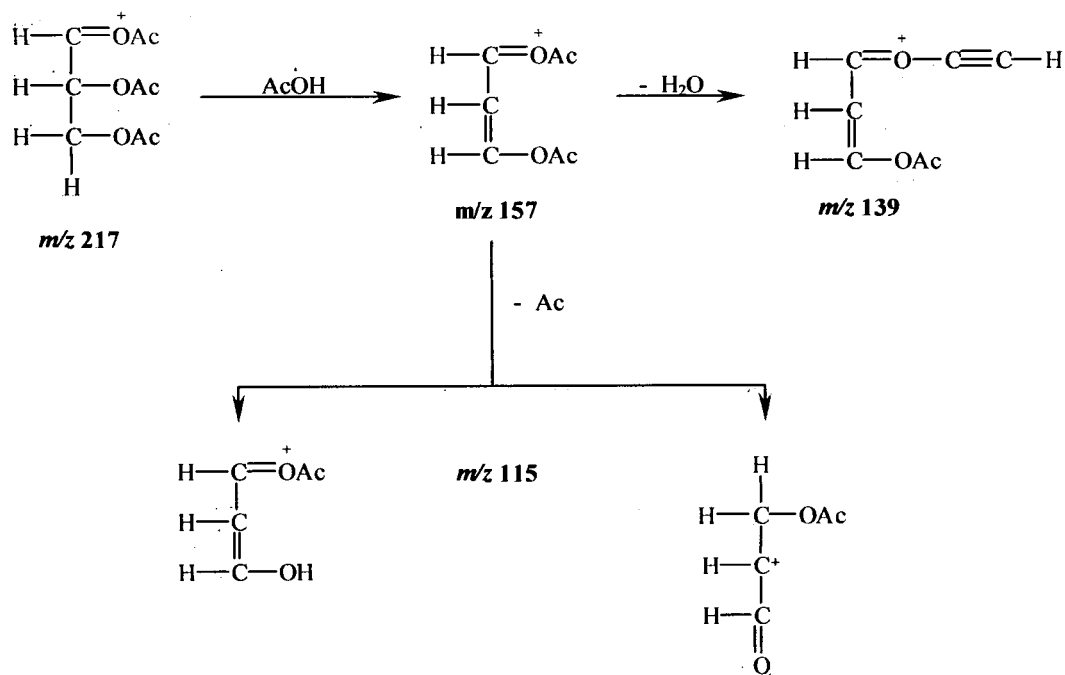
Hexoaminitol hexacetato  
(Glucosamina, Manosamina, Galactosamina)

O pico de fragmentação  $m/z$  43 é o pico base (abundância de 100%) para qualquer derivado acetato de alditol e é correspondente ao fragmento  $\text{CH}_3\text{CO}^-$  ( $\text{AcO}^-$ ).

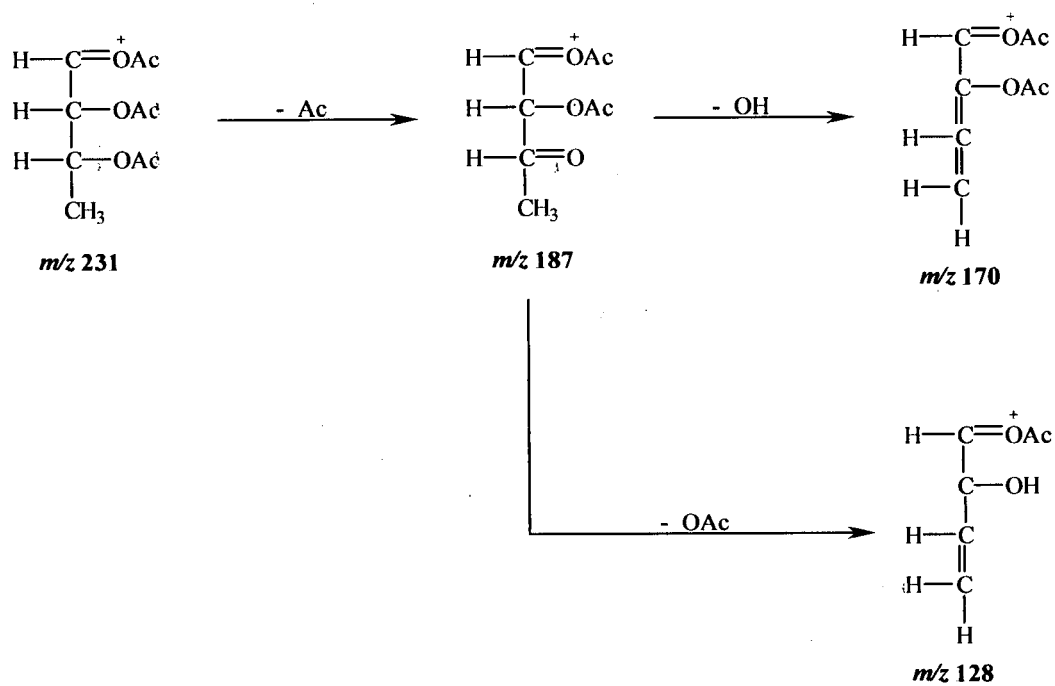


## Fragmentos secundários dos acetatos de alditóis

## HEXITOL



## DEOXI-HEXITOL

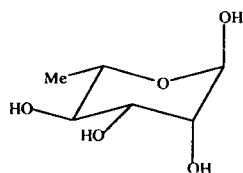


*Identificação dos monossacarídeos presentes nas folhas de B. microstachya*

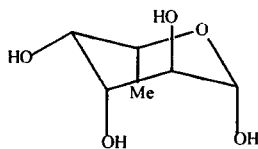
De acordo com os tempos de retenção e a fragmentação primária dos derivados acetatos de alditóis obtidos a partir dos extratos EPA<sub>q</sub>, EPAI<sub>2%</sub>, EPAI<sub>5%</sub> e EPAI<sub>15%</sub> (Figuras 31-35), pode-se identificar diversos monossacarídeos presentes nas folhas de *B. microstachya*. Foram eles: ramnose (LXXI), fucose (LXXII), ribose (LXXIII), arabinose (LXXIV), xilose (LXXV), manose (LXXVI), galactose (LXXVII) e glucose (LXXVIII) (Tabela 12).

**Tabela 12.** Porcentagem relativa de monossacarídeos nos extratos de folhas de *B. microstachya* em relação à área dos picos no cromatograma.

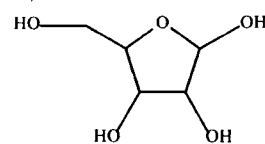
Extratos	Monossacarídios														
	Ram	-	Fuc	-	Rib	-	Ara	-	Xil	-	Man	-	Gal	-	Glu
EPA <sub>q</sub>	5	:	1	:	1	:	24	:	1	:	12	:	30	:	26
EPAI <sub>2%</sub>	13	:	2	:	0	:	40	:	0	:	7	:	24	:	14
EPAI <sub>5%</sub>	15	:	2	:	0	:	45	:	6	:	6	:	15	:	11
EPAI <sub>15%</sub>	15	:	3	:	0	:	31	:	21	:	4	:	14	:	12



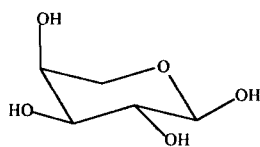
(LXXI)



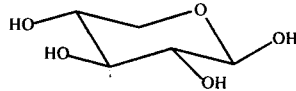
(LXXII)



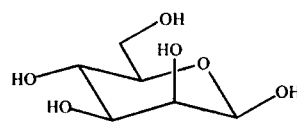
(LXXIII)



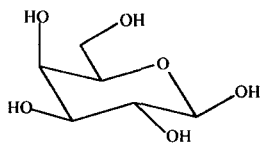
(LXXIV)



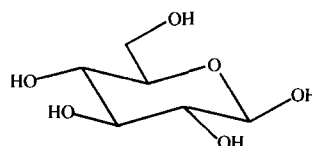
(LXXV)



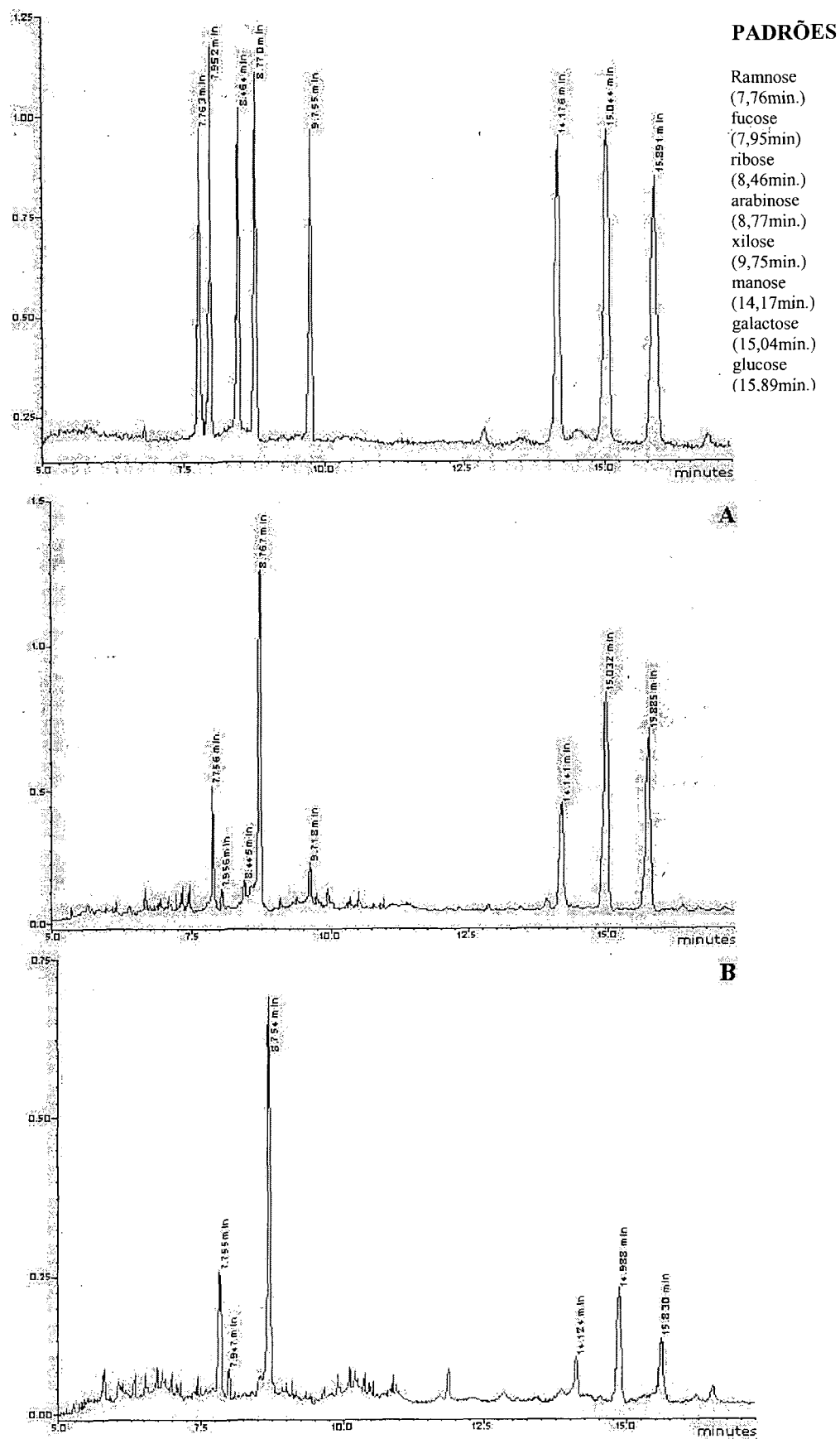
(LXXVI)



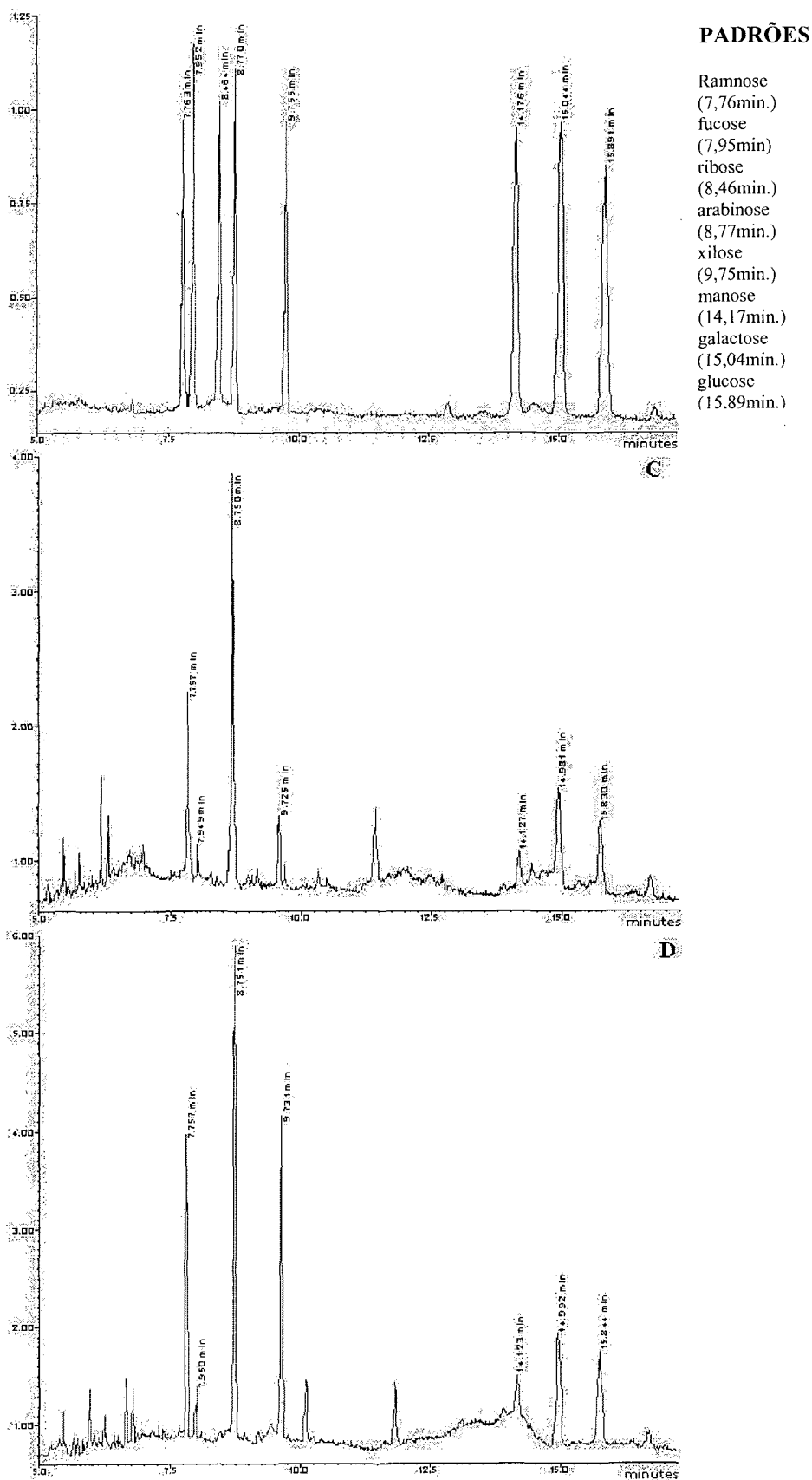
(LXXVII)



(LXXVIII)



**Figura 31.** Cromatogramas de acetatos de alditóis obtidos a partir de padrões monossacarídicos, extrato  $EPA_q$  (A) e extrato  $EPAl_{2\%}$  (B).



**Figura 32.** Cromatogramas de acetatos de alditóis obtidos a partir de padrões monossacarídeos, extrato EPAI<sub>5%</sub> (C) e extrato EPAI<sub>15%</sub> (D).

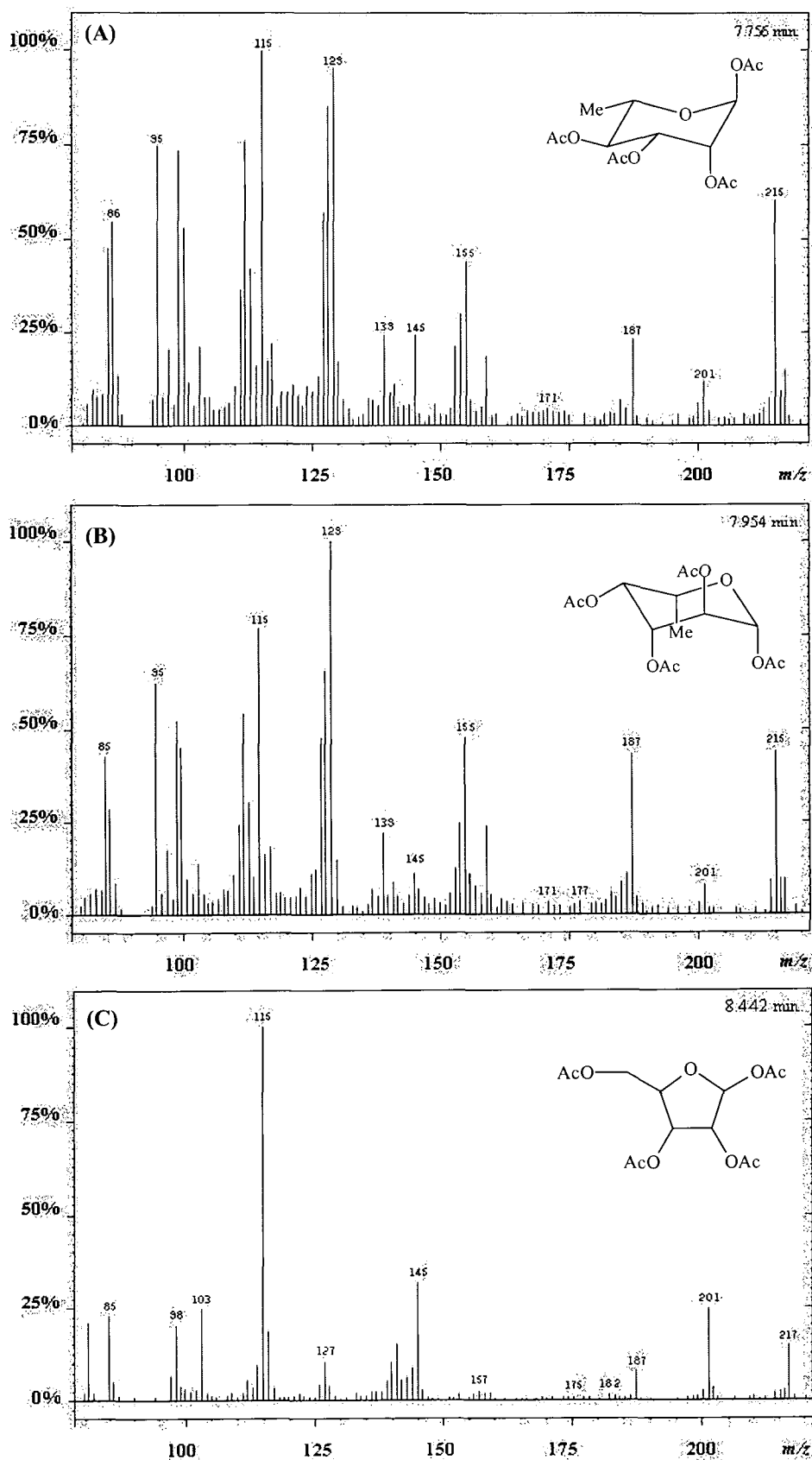


Figura 33. Espectro de massa de acetato de alditol de ramnose (A), fucose (B) e ribose (C).

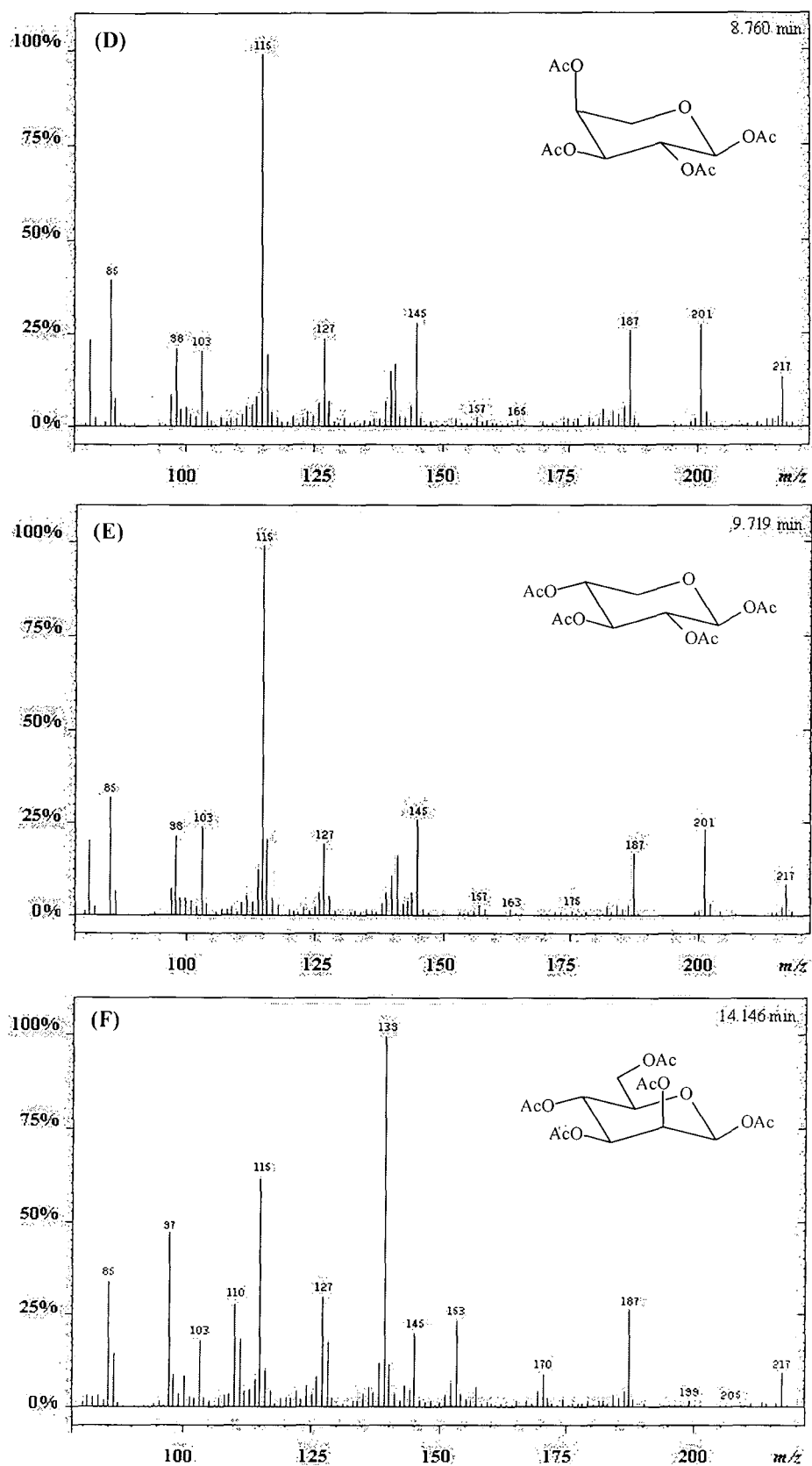


Figura 34. Espectro de massa de acetato de alditol de arabinose (D), xilose (E) e manose (F).

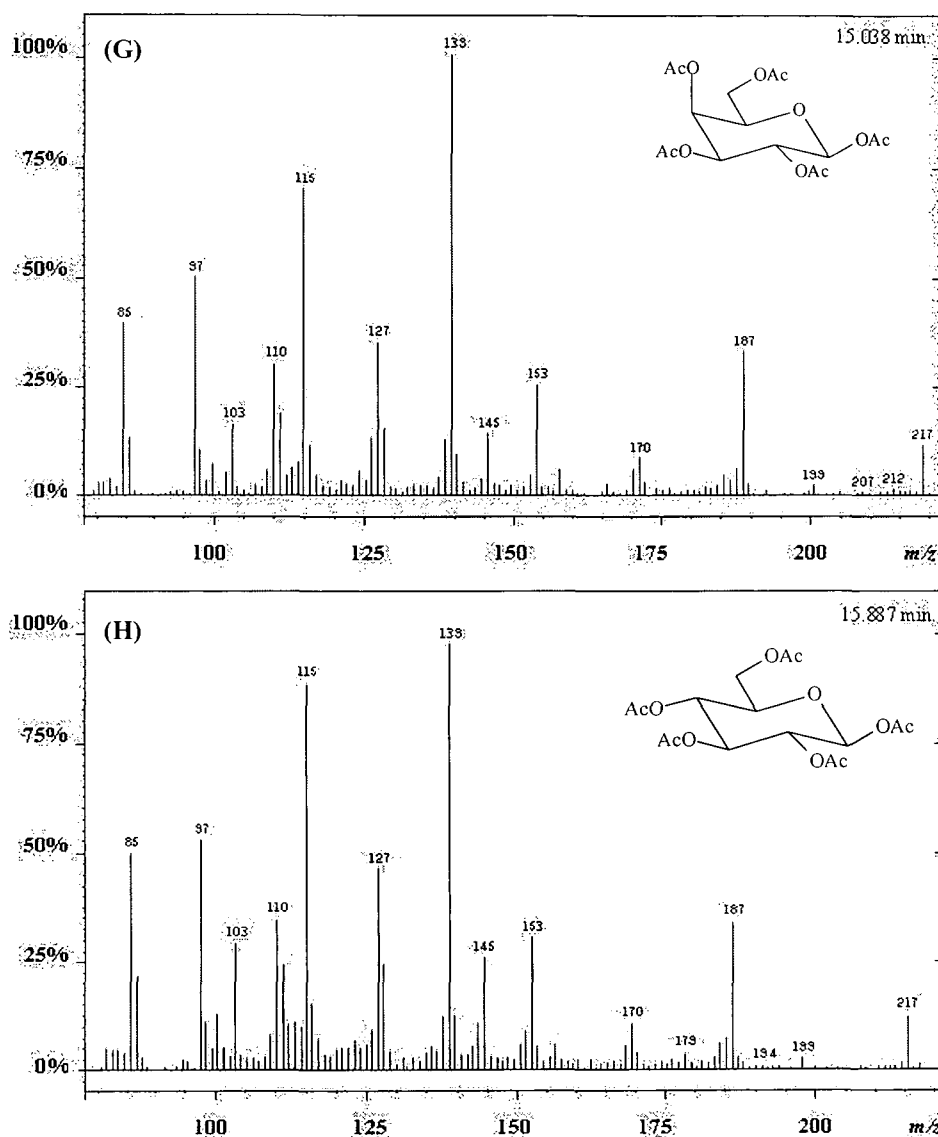


Figura 35. Espectro de massa de acetato de alditol de galactose (G) e glucose (H).

Os principais fragmentos dos acetatos de alditóis formados a partir dos extratos obtidos através do Esquema 5, encontram-se resumidos na Tabela 13.

**Tabela 13.** Identificação de monossacarídeos por espectrometria de massa a partir da fragmentação de acetatos de alditóis.

Monossacarídeos	Tr <sub>(min.)</sub>	m/z
Ramnose	7,75	86, 95, 99, 115, 129, 155, 187, 215
Fucose	7,95	85, 95, 99, 115, 129, 155, 187, 215
Ribose	8,44	85, 98, 115, 115, 127, 145, 201, 217
Arabinose	8,76	85, 98, 103, 115, 127, 145, 201, 217
Xilose	9,71	85, 98, 103, 115, 129, 145, 201, 217
Manose	14,14	85, 97, 115, 127, 139, 153, 187, 217
Galactose	15,03	85, 97, 115, 127, 139, 153, 187, 217
Glucose	15,88	85, 97, 115, 127, 139, 153, 187, 217

Dos extratos analisados, foi observado uma predominância de arabinose em relação aos demais monossacarídeos presentes nas folhas de *B. microstachya*. Apenas traços de fucose e ribose foram encontrados, mesmo que em pequenas proporções, a fucose foi encontrada em todos os extratos analisados, sua maior percentagem foi observada no extrato EPA<sub>I15%</sub> (3%), enquanto que a ribose foi encontrada apenas no extrato EPA<sub>q</sub> (1%).

Dados de literatura demonstram a existência de glicosídeos cuja glicona corresponde ao radical ramnosil, em folhas de *B. microstachya*, desta forma, justificando a presença deste açúcar nas frações analisadas (Tabela 12).<sup>30</sup>

No que se refere aos estudos dos carboidratos, o gênero *Bauhinia* (família Caesalpiniaceae, segundo Cronquist<sup>13</sup> e Leguminosae, segundo Engler<sup>14</sup>) foi muito pouco estudado até presente data. Devido a presença de gomas e mucilagens de interesse industrial, o gênero mais estudado em relação a química dos carboidratos é o gênero *Mimosaceae*. São encontrados galactomananas nas sementes da *Cassia fastuosa*, cuja composição monossacarídica revela a presença de manose (80%) e galactose (18%) e uma pequena mistura de arabinose, xilose, manose e galactose (2%).<sup>115</sup> Na *Acacia campylacantha*, foi relatado a presença de galactose (54%), arabinose (29%) e ramnose (8%). Valores muito próximos destes foram relatados para *Acacia xanthoplolea*, galactose (54%), arabinose (22%) e ramnose (6%). Foi verificado que *Acacia saligna* e *Acacia longifolia* possuem composição monossacarídica muito próxima, galactose (6%), arabinose (5%) e ramnose (6%).<sup>115</sup> Da família Caesalpiniaceae, o jatobá (*Hymenaea courbaril*), é uma das espécies mais estudadas, altos teores de xilose e glucose em extratos hidrolizados de sementes levaram o isolamento de uma nova xiloglucana com cadeia principal composta por glucose ligadas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) com substituições de xilose em O-6.<sup>116,117</sup> A composição monossacarídica de suas folhas revela a presença de ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose. Desses, apenas uma pequena porcentagem de fucose (1,3%) e manose (3,6%) foi observado.<sup>118</sup> Das espécies de leguminosas difundidas no Paraná, a *Mimosa escabrella*, também conhecida como bracinga, também é uma das mais estudadas quanto a química de carboidratos. A alta concentração de galactose e manose em suas folhas conduziu ao isolamento de uma galactomanana.<sup>119</sup> Quanto aos monossacarídeos existentes em seus caules, foi relatado a presença de ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose e



glucose. Deste, a maior porcentagem foi para a xilose (13%), manose (13%) e glucose (20%).<sup>120</sup>

### *Possíveis polissacarídeos encontrados nas folhas de B. microstachya*

Os extratos EPA<sub>q</sub>, EPAI<sub>2%</sub>, EPAI<sub>5%</sub> e EPAI<sub>15%</sub> (Esquema 8), após neutralizados e dialisados foram submetidos ao processo de purificação por congelamento e degelo onde cada extrato deu origem a duas frações: a fração ppt e a fração sobrenadante\* (Tabela 14).<sup>121</sup>

**Tabela 14.** Rendimento das frações obtidas a partir do fracionamento congelamento e degelo.

Frações	(g%)	Frações	(g%)
FPA <sub>q</sub> S	0,21	FPAI <sub>5%</sub> S	2,95
FPA <sub>q</sub> P	0,12	FPAI <sub>5%</sub> P	0,64
FPAI <sub>2%</sub> S	0,26	FPAI <sub>15%</sub> S	2,16
FPAI <sub>2%</sub> P	1,07	FPAI <sub>15%</sub> P	2,02

As frações FPAI<sub>5%</sub>P e FPAI<sub>15%</sub>P, após o fracionamento congelamento e degelo, apresentaram composições monossacarídicas diferentes dos extratos de onde foram geradas (EPAI<sub>5%</sub> e EPAI<sub>15%</sub> respectivamente). Na fração FPAI<sub>5%</sub>P foi observado somente a presença de arabinose, o que sugere-se a existência de uma arabinana. Na fração FPAI<sub>15%</sub>P foi verificado a presença de xilose e arabinose na proporção de 20 e 80% respectivamente, o que sugere-se a existência de uma possível xiloarabinana (Tabela 15).

**Tabela 15.** Proporção monossacarídica das frações obtidas a partir do fracionamento congelamento e degelo.

Extratos	Monossacarídeos														
	Ram	-	Fuc	-	Rib	-	Ara	-	Xil	-	Man	-	Gal	-	Glu
FPA <sub>q</sub> S	0	:	2	:	0	:	66	:	7	:	0	:	25	:	0
FPA <sub>q</sub> P	0	:	5	:	1	:	36	:	9	:	8	:	20	:	22
FPAI <sub>2%</sub> S	0	:	2	:	0	:	66	:	7	:	0	:	25	:	0
FPAI <sub>2%</sub> P	9	:	2	:	0	:	43	:	5	:	4	:	26	:	11
EPAI <sub>5%</sub> S	8	:	3	:	0	:	55	:	7	:	2	:	23	:	2
EPAI <sub>5%</sub> P	0	:	0	:	0	:	100	:	0	:	0	:	0	:	0
EPAI <sub>15%</sub> S	9	:	2	:	0	:	51	:	11	:	4	:	15	:	8
EPAI <sub>15%</sub> P	0	:	0	:	0	:	20	:	80	:	0	:	0	:	0

\* FPA<sub>q</sub>S: Fração polissacarídica aquosa sobrenadante; FPA<sub>q</sub>P: Fração polissacarídica aquosa precipitada; FPAI<sub>2%</sub>S: Fração polissacarídica alcalina 2% sobrenadante; FPAI<sub>2%</sub>P: Fração polissacarídica alcalina 2% precipitada; FPAI<sub>5%</sub>S: Fração polissacarídica alcalina 5% sobrenadante; FPAI<sub>5%</sub>P: Fração polissacarídica alcalina 5% precipitada; FPAI<sub>15%</sub>S: Fração polissacarídica alcalina 15% sobrenadante; FPAI<sub>15%</sub>P: Fração polissacarídica alcalina 15% precipitada.

Para a determinação da estrutura da cadeia principal desses polissacarídeos, faz-se de início a metilação do material (aproximadamente 40mg),<sup>122</sup> cuja finalidade é definir quais hidroxilas estariam livres antes da hidrólise do material. As hidroxilas resultantes do processo de hidrólise são então acetiladas e o material é submetido à análise por CG-MS e <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C para a identificação dos monossacarídeos e as posições que antes formavam o polissacarídeo.

A determinação estrutural dos possíveis polissacarídeos oriundos das frações FPAI<sub>5%</sub>P e FPAI<sub>15%</sub>P não foi possível neste trabalho, mas deve ser priorizada em trabalhos futuros.

## 4

## Experimental

### *Coleta do material*

### *Abordagem fitoquímica*

### *Preparação dos extratos*

### *Teor de flavonóides*

*Isolamentos químicos: BM1, BM2, BM3, BM4, BM5, BM6 e BM7*

*Obtenção de frações contendo taninos*

*Precipitação, neutralização, diálise, liofilização de extratos polissacarídicos*

*Hidrólise ácida de extratos polissacarídicos*

*Redução dos monossacarídeos a alditóis*

*Acetilação*

*Análise de CG-EM*

*Fracionamento através de congelamento e degelo dos extratos EPA<sub>7</sub>, EPAL<sub>2%</sub>, APAL<sub>5%</sub> e EPAL<sub>15%</sub>*

*Fracionamentos dos extratos EHF, ECF e FAEF por cromatografia líquida em coluna preparativa*

*Doseamento de flavonóides totais*

*Ensaio antioxidantes*

- Redução do complexo fosfomolibdênico
- Redução do DPPH
- CCD

*Equipamentos e reagentes*

### *Coleta do material*

Folhas e caules de *B. microstachya* (4,2kg) foram coletadas em fevereiro de 2002 em Morretes-PR. A espécie foi identificada pelo Dr. Gerdt Hatschbach e uma exsicata sob número de registro 264361 foi depositada no *Herbarium* do Museu Botânico de Curitiba.

### *Abordagem fitoquímica de extratos de folhas e caules de B. microstachya*

Folhas e caules de *B. microstachya* (100g) foram extraídos por maceração (96h) com EtOH 70%. Os extratos obtidos foram concentrados em rotavapor (40°C) e analisados segundo marcha fitoquímica clássica descrita por Matos em 1988.<sup>93</sup> As classes químicas investigadas foram flavonóides, antocianinas, antocianidinas, taninos, esteróides, triterpenóides, alcalóides, saponinas, heterosídeos cianogênicos e cardiotônicos.

### *Preparação dos extratos*

Dois esquemas de extração foram adotados, um, visando a extração de metabólitos secundários das folhas de *B. microstachya*, outro, visando a extração de metabólitos secundários das folhas e caules de *B. microstachya*.

### Investigação dos metabólitos primários

Aproximadamente 95g das folhas de *B. microstachya* foram secas (45°C, 48h), moídas, desengorduradas com C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> em aparelho Soxhlet e extraídas com H<sub>2</sub>O, sob refluxo, por um período de duas horas. O resíduo dessa extração foi tratado com sol. de KOH 2% que posteriormente foi tratado com sol. de KOH 5% e 15%, respectivamente conforme mostra o Esquema 9. Dessa forma, quatro extratos foram obtidos (Tabela 16).

**Tabela 16.** Extratos obtidos de folhas de *B. microstachya* visando a identificação de metabólitos primários.

Folhas			
<i>EPA<sub>q</sub></i>	Extrato polissacarídico aquoso	<i>APAI<sub>5%</sub></i>	Extrato polissacarídico alcalino 5%
<i>APAI<sub>2%</sub></i>	Extrato polissacarídico alcalino 2%	<i>APAI<sub>15%</sub></i>	Extrato polissacarídico alcalino 15%

### Investigação dos metabólitos secundários

Folhas e caules de *B. microstachya* foram secos (45°C, 48h), moídos e macerados (96h) separadamente com C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, CHCl<sub>3</sub>, EtOH-H<sub>2</sub>O (90:10). Os extratos etanólicos foram concentrados em rotavapor (40°C), desclorofilados e particionados com DCM, CHCl<sub>3</sub> e AcOEt (Esquema 10). A mesma metodologia adotada para a extração das folhas foi adotada para a extração dos caules, dessa forma quatorze extratos foram obtidos (Tabela 17).

**Tabela 17.** Extratos obtidos de folhas de *B. microstachya* visando a identificação de metabólitos secundários bem como a determinação de possíveis atividades antioxidantes.

Folhas		Caules	
<i>EHF</i>	Extrato hexânico	<i>EHC</i>	Extrato hexânico
<i>ECF</i>	Extrato clorofórmico	<i>ECC</i>	Extrato clorofórmico
<i>EBEF</i>	Extrato bruto etanólico	<i>EBEC</i>	Extrato bruto etanólico
<i>EEF</i>	Extrato etanólico	<i>EEC</i>	Extrato etanólico
<i>FDCMF</i>	Fração diclorometano	<i>FDCMC</i>	Fração diclorometano
<i>FAEF</i>	Fração acetato de etila	<i>FAEC</i>	Fração acetato de etila
<i>FA<sub>q</sub>F</i>	Fração aquosa	<i>FA<sub>q</sub>C</i>	Fração aquosa

### *Isolamento da substância BM1*

Parte da fração FAEF (1g) foi acetilada e cromatografada em coluna de sílica gel 60 230-400 mesh (12 x 3cm), com solventes cujo gradiente de polaridade aumentava com as eluições. Dessa forma foram coletadas 45 frações (10ml cada) e as frações 10-12 ( $C_6H_{14}$ - $CHCl_3$  (2:8)) reunidas por semelhança após monitoramento por CCD ( $SiO_2$  F<sub>254</sub>). Aproximadamente, 100mg de um sólido branco-amarelado foi obtido e recromatografado em coluna de sílica gel 60 70-230 mesh (10 x 2cm), com solventes de gradiente de polaridade crescente ( $C_6H_{14}$ - $Me_2CO$ ). Assim, foram coletadas 20 frações (10ml cada), sendo reunidas por semelhança as frações 15-18 que após evaporação do solvente resultou em 30mg de um sólido branco, ainda impuro, quando cromatografado em CCD. A purificação final foi conseguida em coluna de Sephadex® LH20 (5 x 3cm) em  $Me_2CO$ , resultando em 2,8mg de um sólido branco que foi cristalizado em MeOH.

### *Isolamento da substância BM2*

Aproximadamente 26g da fração FAEF foram ressuspensas em  $Me_2CO$  havendo dessa forma precipitação de 40mg de um sólido amarelado que foi cromatografado em coluna de sílica gel 60 230-400 (12cm x 1cm) com uma mistura de solventes de polaridade crescente ( $C_6H_{14}$ ,  $CHCl_3$ , AcOEt e MeOH), assim, 20 frações foram coletadas (10ml cada). As frações MeOH foram reunidas, secas e ressuspensas em  $CHCl_3$ , havendo precipitação de um sólido amarelo amorfo que foi filtrado a vácuo e lavado sucessivas vezes com  $C_6H_{14}$  e  $CHCl_3$ . O precipitado foi seco em aparelho de Abderhalden com  $P_2O_5$  resultando em 3mg de um sólido amarelo que apresentou-se purificado quando cromatografado por CCD ( $SiO_2$  F<sub>254</sub>).

### *Isolamento da substância BM3*

Parte da fração FAEF (5g) foi cromatografada em coluna de sílica gel 60 230-400 mesh (12cm x 3cm), com solventes de polaridade crescente ( $C_6H_{14}$ ,  $CHCl_3$ , AcOEt e MeOH). Dessa forma, 85 frações (10ml cada) foram coletadas e as frações 13-45 ( $CHCl_3$ -MeOH (8:2) e  $CHCl_3$ -MeOH (7:3)) reunidas por semelhança quando monitoradas por CCD ( $SiO_2$  F<sub>254</sub>). Dessa maneira, 2g de um sólido alaranjado foram obtidos sendo uma parte (1g) recromatografada em coluna de Sephadex® LH20 (45 x 2cm) com MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1). Assim, foram coletadas 62 frações (10ml cada). As frações 20-22 foram reunidas por semelhança após monitoramento por CCD, resultando em 16mg de um sólido amarelo amorfo que foi recromatografado em coluna de Sephadex® LH20 (10 x 1cm) com EtOH, resultando em 4,5mg de um sólido amarelo pálido que apresentou apenas uma única mancha quando cromatografado por CCD.

### *Isolamento da substância BM4*

Parte do sólido laranja obtido no fracionamento de BM3 (1g) foi solubilizado em MeOH e cromatografado em CCDP ( $SiO_2$  F<sub>254</sub>) com AcOEt. Cinco bandas foram obtidas e pela proximidade de duas delas não obteve-se total separação, sendo assim, essas bandas foram raspadas da placa, suspensas em MeOH e o sólido obtido foi cromatografado em coluna de Sephadex® LH20 (15 x 2cm) com EtOH. Dessa forma, 31 frações foram obtidas (7ml cada), sendo que duas delas, 2 e 3 foram reunidas por semelhança (CCD,  $SiO_2$  F<sub>254</sub>) resultando em 1,6mg de sólido branco-amarelado que apresentou-se puro quando cromatografado em CCD.

### *Isolamento da substância BM5*

Os extratos EHF e ECF quando cromatografados em CCD ( $\text{SiO}_2$  F<sub>254</sub>) utilizando  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ -AcOEt (1:1) como fase móvel e vanilina sulfúrica como sol. reveladora, mostraram-se semelhantes quanto a composição química, dessa forma, 9g de EHF e 4g de ECF foram reunidos e cromatografados em coluna de sílica gel 60 230-400 mesh (10 x 7cm) com solventes de gradiente crescente de polaridade (éter de petróleo,  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , DCM,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt, EtOH e MeOH). Dessa forma, 240 frações (15ml cada) foram coletadas, sendo as frações 3-20 (éter de petróleo) reunidas por semelhança após monitoramento por CCD ( $\text{SiO}_2$  F<sub>254</sub>). Essas frações foram secas, solubilizadas em  $\text{C}_6\text{H}_{14}$  e pela adição de EtOH ocorreu precipitação de um sólido que foi filtrado a vácuo em funil de vidro sinterizado e lavado com EtOH e MeOH, obtendo-se assim, 32mg de um sólido branco que apresentou-se purificado quando cromato-grafado em CCD.

### *Isolamento das substâncias BM6 e BM7*

As frações 25-34 da CLC anterior foram reunidas por semelhança quando cromatografadas em CCD ( $\text{SiO}_2$  F<sub>254</sub>) tendo o  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ -AcOEt (1:1) como fase móvel e sol. de vanilina- $\text{H}_2\text{SO}_4$  como sol. reveladora. Dessa forma, obteve-se 80mg de um sólido amarelo que foi recromatografado em CCDP utilizando o  $\text{C}_6\text{H}_{14}$ -AcOEt- $\text{CHCl}_3$  (2:2:1) como fase móvel. Dessa forma, dois compostos foram obtidos, os quais foram chamados de BM6 e BM7. O primeiro, consistia em um sólido amarelo de aparência graxa (4,2mg) solúvel em  $\text{C}_6\text{H}_{14}$  e o segundo, um sólido avermelhado (3mg), solúvel em MeOH.

### *Frações contendo taninos obtidas da FAEF*

As frações FAEF (2g) e FAEC (2g) foram submetidas a cromatografia líquida em coluna preparativa de sílica gel 60 230-400 mesh e eluídas com solventes de gradiente crescentes de polaridade ( $C_6H_{14}$ , AcOEt,  $Me_2CO$  e  $H_2O$ ). Dessa forma, 12 frações (20ml cada) a partir da FAEF e 23 frações (20ml) a partir da FAEC foram agrupadas por semelhança (CCD,  $SiO_2$  F<sub>254</sub>) quando eluídas com misturas de solventes  $Me_2CO$ - $H_2O$  nas proporções 8:2, 7:3, 6:4 e 5:5. Após evaporação do solvente, foi verificado a precipitação de sólidos amorfos de coloração parda (300mg e 425mg) os quais foram chamados de fração FTF e fração FTC respectivamente. Testes fitoquímicos (reação com sol.  $FeCl_3$  10%, reação com sol.  $Pb(AcO)_2$  5% e ppt de proteínas) revelaram a presença de taninos nessas duas frações.

### *Precipitação, neutralização, diálise e liofilização dos extratos dos extratos $EPA_q$ , $EPAl_{2\%}$ , $EPAl_{5\%}$ e $EPAl_{15\%}$*

Os extratos obtidos (Tabela 14) foram precipitados com EtOH absoluto (3:1 v/v, EtOH : Extrato), centrifugados, neutralizados com AcOH glacial, dialisados (24h) em água corrente e posteriormente liofilizados para determinação dos rendimentos.<sup>123</sup>

### *Hidrólise ácida total dos extratos dos extratos $EPA_q$ , $EPAl_{2\%}$ , $EPAl_{5\%}$ e $EPAl_{15\%}$*

Aproximadamente, 50mg de cada extrato liofilizado ( $EPA_q$ ,  $EPAl_{2\%}$ ,  $EPAl_{5\%}$  e  $EPAl_{15\%}$ ) foram hidrolizados com TFA (1ml, 2mol/l, 100°C, 5h). As frações obtidas foram filtradas separadamente em algodão e deixadas em capela a temperatura ambiente, até evaporação do TFA.<sup>123,124</sup>



### *Redução dos monossacarídeos extraídos a alditóis*

Os monossacarídeos obtidos a partir da hidrólise ácida dos extratos EPAq, APAI<sub>2%</sub>, APAI<sub>5%</sub> e APAI<sub>15%</sub> foram ressuspensos em água destilada e reduzidos com NaBH<sub>4</sub> até a solução apresentar pH 9 (2h, 25°C). Os íons Na<sup>+</sup> presente nas amostras, foram removidos pela permeação em resina catiônica (LEWATTIT® S-100). As frações obtidas foram evaporadas até a secura em rotavapor (65°C) e o ácido bórico formado foi removido pela adição de metanol na forma de borato de tetrametila; composto volátil eliminado em rotavapor (40°C).<sup>125</sup>

### *Acetilação*

Os alditóis formados foram tratados com Ac<sub>2</sub>O e piridina (1:1) em recipientes fechados (8h), extraídos com CHCl<sub>3</sub>. A piridina foi eliminada pela complexação com o cobre. Para isto, foi utilizada uma sol. 5% de CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O.<sup>126</sup>

### *Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)*

Os acetatos de alditóis formados foram analisados em CG-EM modelo Varian® Satur 2000 R, utilizando coluna capilar J & W, DB 225, 30 m, 0,25 mm, com filme de fase estacionária cianopropilfenil (50%) – metilpolisiloxane. Condições analíticas: He como gás carreador, temperatura inicial 50 °C e final 225 °C, rampa de aquecimento 40 °C/min.<sup>113</sup>

O composto BM5 foi analisado em CG-EM modelo HP® utilizando coluna capilar de fenilmetilsiloxano, tendo o He como gás carreador. O volume de injeção foi de 0,1µl, temperatura inicial 50 °C e final de 250 °C, rampa de aquecimento 40°C/min.

*Fracionamento através de congelamento e degelo dos extratos EPA<sub>q</sub>, EPAI<sub>2%</sub>, EPAI<sub>5%</sub> e EPAI<sub>15%</sub>*

Os extratos EPA<sub>q</sub>, EPAI<sub>2%</sub>, EPAI<sub>5%</sub> e EPAI<sub>15%</sub> (Esquema 8), após neutralizados e dialisados foram submetidos ao processo de purificação por congelamento e degelo. Cada um dos extratos foi ressuspenso em H<sub>2</sub>O destilada e a seguir submetidos ao congelamento e posterior degelo em temperatura ambiente. O ppt insolúvel em H<sub>2</sub>O fria foi separado dos demais componentes solúveis por centrifugação (10.000 r.p.m, 30 min. 4°C). Esse procedimento foi repetido diversas vezes até que não houvesse mais formação de ppt após degelo e centrifugação. Após as etapas anteriormente descritas, os sobrenadantes foram reunidos, bem como os ppt, congelados e liofilizados. Em tal processo, cada extrato deu origem a duas frações: o ppt e o sobrenadante do congelamento e degelo. Dessa forma, oito foram as frações obtidas (Tabela 18).<sup>121</sup>

**Tabela 18.** Frações obtidas a partir da purificação congelamento e degelo dos extratos EPA<sub>q</sub>, EPAI<sub>2%</sub>, EPAI<sub>5%</sub> e EPAI<sub>15%</sub>.

Nomes das frações	
<i>FPA<sub>q</sub>S</i>	Fração polissacarídica aquosa sobrenadante
<i>FPA<sub>q</sub>P</i>	Fração polissacarídica aquosa precipitado
<i>FPAI<sub>2%</sub>S</i>	Fração polissacarídica alcalina 2% sobrenadante
<i>FPAI<sub>2%</sub>P</i>	Fração polissacarídica alcalina 2% precipitado
<i>FPAI<sub>5%</sub>S</i>	Fração polissacarídica alcalina 5% sobrenadante
<i>FPAI<sub>5%</sub>P</i>	Fração polissacarídica alcalina 5% precipitado
<i>FPAI<sub>15%</sub>S</i>	Fração polissacarídica alcalina 15% sobrenadante
<i>FPAI<sub>15%</sub>P</i>	Fração polissacarídica alcalina 15% precipitado

Na sequência, todas as frações foram hidrolisadas, reduzidas, acetiladas e analisadas do CG-MS.

*Fracionamentos dos extratos EHF, ECF e FAEF por cromatografia em coluna de sílica gel e Sephadex®*

Foram utilizadas colunas cromatográficas de vidro com tamanhos (altura e diâmetro) variados. As fases estacionárias utilizadas foram a SiO<sub>2</sub> gel (70-230 e 230-400 mesh) e o Sephadex® LH20. Os solventes usados como fases móveis foram H<sub>2</sub>O, MeOH, EtOH, Me<sub>2</sub>CO, AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, DCM, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O e C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.

*Doseamento de flavonóides totais*<sup>98</sup>

Folhas secas e trituradas de *B. microstachya* (600mg) foram colocadas em um balão de fundo redondo juntamente com sol. aquosa de hexametilenotretamina (0,5%, 1ml), sol. de HCl (25%, 2ml) e C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (20ml). A mistura foi aquecida sob refluxo (30min.), resfriada a temperatura ambiente e filtrada em algodão para um balão volumétrico de 100ml. Para que toda a massa flavonóidica presente na amostra fosse extraída, o resíduo da extração anterior foi reextraído sob refluxo com Me<sub>2</sub>CO (25ml, 10min., 2x), o filtrado foi transferido para o mesmo balão volumétrico e o volume completado com C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O para 100ml. Uma alíquota (20ml) dessa sol. foi transferida para um funil de separação onde foi adicionado água (30ml) e AcOEt (15ml) sendo na seqüência particionado. Este procedimento foi repetido até que o volume de AcOEt fosse próximo a 50ml (3x). As frações AcOEt obtidas foram transferidas a um segundo funil de separação e particionadas com água (50ml, 2x), dessa forma, a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica transferida para um balão volumétrico de 50ml onde teve o volume aferido com AcOEt (sol. A).

Uma alíquota da sol. A (10ml) foi transferida para um balão volumétrico de 25ml ao qual foi adicionado o reativo AlCl<sub>3</sub>\* (1ml), por fim, o volume completado para 25ml com sol. B\*\*. Após 30min. de reação, a amostra (3ml) foi lida a 422nm em um espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu®, porém, como a sol. a ser doseada apresentava antes da reação com o reativo AlCl<sub>3</sub> um cromóforo, houve necessidade de uma sol. de compensação que consistiu em uma alíquota da sol. A (10ml) completado o volume para 25ml com a sol. B usada no preparo do reativo AlCl<sub>3</sub>. O conteúdo total de flavonóides da amostra analisada foi determinado pela equação:

$$\%Flavonóides = \frac{A \cdot 1,25}{m}$$

Onde: A = absorbância à 422nm, m = massa da substância em gramas.

\* 20g de AlCl<sub>3</sub> em 100ml de solução B.

\*\* Metanol - ácido acético glacial (95:5, v/v).

### *Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico*

Os extratos obtidos (Esquema 9 e Tabela 13) (200 µg/ml, 0,3ml) foram tratados com sol. do complexo fosfomolibdênico anteriormente preparado\* (3ml, 100°C). Após atingido o tempo de reação (90min.), a absorbância foi determinada a 695nm em um espectrofotômetro UV-Vis 1601 Shimadzu®. Da mesma forma, foi determinado a absorbância dos padrões quercetina e ácido ascórbico nas mesmas concentrações e condições de análise.<sup>127</sup>

### *Ensaio da redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)*

As frações FAEF e FAEC e os componentes isolados BM3 e BM4 foram secos respectivamente em rotavapor (40°C) e aparelho de Abderhalden (60°C), diluídos em EtOH de forma a serem obtidas sol. nas concentrações de 0,75, 1,5, 3, 6 e 12 µg/ml para a fração FAEF, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 µg/ml para a fração FAEC, 5, 10, 20 e 30 µg/ml para o composto BM3 e 8, 12, 16 e 32 µg/ml para o composto BM4. Na sequência, as sol. obtidas (2,5ml) foram incorporadas a sol. EtOH de DPPH (1,0ml, 0,3mM). O controle foi formado apenas pela reação do EtOH (2,5ml) com sol. de DPPH (1,0ml, 0,3mM). O branco foi formado apenas pela mistura de EtOH (1ml) com as sol. obtidas (2,5ml), de modo que, para cada concentração existiu um branco. Todas as reações foram feitas em triplicata e nas mesmas condições de análise (30min., 25°C). Após o tempo de reação (30min), a absorbância das amostras foram determinadas a 518nm em um espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu®. Os resultados obtidos foram comparados com padrões clássicos antioxidantes, quercetina, rutina e ácido ascórbico.<sup>43,103</sup>

\* O complexo fosfomolibdênico, é formado pela reação de sol. de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (28ml, 0,1mol/l) com sol. de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (12ml, 0,03mol/l) e sol. de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (20ml, 3mol/l), sendo posteriormente o volume completado com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para 100ml.

### *Avaliação da atividade antioxidante de um componente puro por CCD*

As substâncias isoladas foram submetidas a cromatografia por CCD e reveladas com sol. 0,2% de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) em MeOH. As placas contendo sol. de DPPH em suas superfícies, portanto, com coloração purpura, foram observadas por um período de 30min. O aparecimento de manchas amarelas (*spots*) em contraste com a coloração púrpura revelam atividade antioxidante.<sup>102,110</sup>

### *Ensaio antimicrobiano*

Extratos de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (EBEF, EBEC, FAEF e FAEC), foram testados com o objetivo de determinar uma possível atividade antimicrobiana (através da CIM\*), frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os métodos utilizados foram a diluição em ágar e a difusão em disco (método de Bauer e Kirby).<sup>128-130</sup>

### *Preparo das amostras*

Os extratos EBEF, EBEC, FAEF e FAEC foram secos em rotavapor (40°C), dissolvidos em sol. EtOH 40% de maneira a serem obtidas sol. nas concentrações de 100.000, 50.000, 25.000, 12.500 e 6.250µg/ml que posteriormente foram filtradas em membrana Millipore® 0,45µm.

### *Preparo do meio de cultura*

Certa quantidade de ágar Mueller-Hinton® (34g) foi suspensa em água destilada (1l) de forma que, a suspensão obtida após autoclavada (120°C, 15min.) e resfriada (50°C) foi vertida em placas de Petri estéreis (20ml/placa) que solidificaram

---

\* CIM: concentração inibitória mínima.

quando resfriadas à temperatura ambiente..As placas foram fechadas e reservadas para inoculação das cepas.

#### *Preparo do inóculo*

Cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram repicadas em ágar Mueller-Hinton® e incubadas a 36°C durante 24h. Imediatamente após esse período, as culturas foram utilizadas para o preparo dos inóculos. Uma pequena porção das colônias formadas foi tomada e suspensa em sol. salina estéril (0,05ml de BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O a 1,175% em 9,95ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%) de forma a ser obtido uma turbidez padrão a escala McFarland. De acordo com as espécies bacterianas utilizadas, quatro foram as suspensões obtidas.

#### *Ensaio da difusão em disco (método de Bauer e Kirby)*

As suspensões bacterianas (~50µl) foram incubadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton® com auxílio de um swab. Por aproximadamente cinco minutos, a superfície do ágar contendo o inóculo foi deixado em repouso para que o mesmo secasse. Na seqüência, as sol. de EBEF, EBEC, FAEF e FAEC (10µl) foram distribuídas em discos de papel (6mm Ø) de forma a serem obtidas concentrações iguais a 62,5, 125, 250, 500 e 1.000µg/disco de extrato. Os discos foram secos à temperatura ambiente e distribuídos nas placas com ágar Mueller-Hinton® previamente incubadas em estufa (36 ± 1°C, 24h). Após esse período as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de inibição (medidos em mm). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tiveram como controle positivo o antibiótico cloranfenicol (10µg/disco).<sup>131</sup>

### *Ensaio da diluição em ágar*

Volumes de ágar Mueller-Hinton® (30ml ) autoclavado e resfriado (45°C) foram acrescidos de quantidades adequadas das soluções anteriormente preparadas de modo a encerrar uma massa de 5.000µg/placa (5ml, sol. 1.000µg/ml) para os extratos EBEF, EBEC e 1.000µg/placa (1ml, sol. 1.000µg/ml) para os extratos FAEF e FAEC. As misturas foram distribuídas para placas de petri estéreis e deixadas solidificar a temperatura ambiente. Aliquotas (10µl) dos inóculos de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* anteriormente preparados foram adicionados as placas que foram incubadas em estufa (36 ± 1°C, 24h).

### *Equipamentos e reagentes\* utilizados*

**RMN <sup>1</sup>H:** espectrômetro Bruker® AC-4.7-T (200MHz) e espectrômetro Bruker® ARX-9.4-T400® (400 MHz). **CG-EM:** cromatógrafo gasoso Varian Satur®, modelo 2000-R com coluna capilar J & B, DB 225, 30m, 0,25mm, cianopropilfenilmetiloxano como fase estacionária e cromatógrafo gasoso HP® 6890 utilizando coluna capilar de fenilmetilsiloxano como fase estacionária. **UV-Vis:** espectrofotômetro Shimadzu®, modelo 1601. **IV:** espectrômetro Bomen Hartmann & Braun®, modelo B-100 utilizando pastilhas de KBr. **CC (fases estacionárias):** sílica gel 60 70-230 mesh e 230-400 mesh (Merck® e Aldrich®) e Sephadex® LH20 (Pharmacia®). **CCD:** cromatoplasas em sílica gel F<sub>254</sub> (Merck®) em lâminas de zinco. **CCDP:** cromatoplasas em sílica gel F<sub>254</sub> (Merck®) em placas de vidro. **Solventes:** MeOH, EtOH, DCM, AcOEt, AcOH, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, Me<sub>2</sub>CO, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O, éter de petróleo, (Merck®, Synth® e Quimex®), CDCl<sub>3</sub> (Aldrich®) e DMSO-<sub>d6</sub> (Sigma). **Reagentes:** DPPH (Sigma®), difenilboril-oxietilamina (Lancaster®), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KOH, NaBH<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub>, vanilina, piridina, polietilenoglicol, anisaldeído (Merck®, Reagen®). **Padrões:** ácido ascórbico (Reagen® e Merck®), quercetina e Rutina (Merck®), ácido tânico e ácido gálico (Reagen®), ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose (Sigma®). **Meio de cultura:** ágar Mueller-Hinton®

\* Todos os solventes foram destilados e purificados antes do uso.<sup>132</sup>

(Diagnolab®). **Resina de troca iônica:** grupo sulfônico/poliestireno (Prodicil®). **Ponto de fusão:** Reichert®.



## 5

---

*Conclusão*

---

- I. Extratos brutos etanólicos obtidos das folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbrid., Caesalpinaceae, bem como frações obtidas em acetado de etila (das folhas e caules), nas concentrações de 200µg/ml, apresentaram alta atividade antioxidante relativa quando comparados com padrões antioxidantes de ácido ascórbico e quercetina pela metodologia da redução do complexo fosfomolibdênico.
- II. As frações acetato de etila das folhas e caules de *B. microstachya*, quando submetidas a reação de redução do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foram mais ativas que padrões antioxidantes de ácido ascórbico e rutina, com IC<sub>50</sub> de 2,75 e 2,86µg/ml em relação a 36 e 8,13µg/ml dos padrões, respectivamente.
- III. Dos extratos obtidos das folhas da espécie em estudo, foram isolados seis substâncias (BM1, BM2, BM4, BM5, BM6 e BM7) e uma fração constituída por pelo menos quatro substâncias que foi chamada de BM3. A substância BM2 foi identificada como sendo o flavonóide vitexina (8-C-glucosil-apigenina). A substância BM4 foi identificada como sendo o benzenóide galato de metila. A substância BM5 foi identificada como sendo o hidrocarboneto de cadeia saturada, forma molecular C<sub>36</sub>H<sub>74</sub>, hexatriacontano. As substâncias BM1, BM6 e BM7 não puderam ser iden

tificadas por falta de dados espectroscópicos, embora o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de BM7 indicou uma provável estrutura esteroideal ou triterpênica, não glicosilada.

- IV. As substâncias da fração BM3 e a substância BM4 quando submetidas a reação de redução do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), apresentaram significativa atividade antioxidante, com  $\text{IC}_{50}$  de 7,13 e 29,20  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. A substância BM2, também apresentou-se ativa quando submetida a cromatografia em camada delgada e revelada com sol. EtOH 0,2% de DPPH, porém, pelo baixo rendimento não pode ser quantificada.
- V. Nos extratos aquoso e alcalinos das folhas de *B. microstachya* foram identificados os monossacarídeos: ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose.
- VI. Os extratos brutos etanólicos e as frações acetato de etila das folhas e caules de *B. microstachya* não apresentaram atividade antimicrobiana frente cepas de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* nas concentrações testadas quando utilizados os métodos da difusão e da diluição em ágar.

## REFERÊNCIAS\*

- (1) Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A.; Borin, M. R. *Biodiversidade: um enfoque quimio-biológico*; Editora UERJ: Rio de Janeiro, 1996.
- (2) Peruzzo, T. M.; Canto, E. L. *Química na abordagem do cotidiano*; 1 ed.; Moderna, 1993; Vol. 3.
- (3) Wheelwright, E. G. *Medicinal plants and their history*; Dover Publications: New York, 1974.
- (4) Verpoorte, R.; Maraschin, M. In *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*; 1 ed.; Yunes, R. A., Calixto, J. B., Eds.; Argos: Chapecó, 2001; Vol. 1, p 523.
- (5) Peterson, J.; Dwyer, J. *Nutritium Research* **1998**, *18*, 1995-2018.
- (6) Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. *Ciência Hoje* **1993**, *15*, 51-54.
- (7) Gottlieb, O. R. *Interciencia* **1981**, *6*, 22-29.
- (8) Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. *Química Nova* **2001**, *24*, 105-111.
- (9) Stevens, L. H. Ph.D thesis, Leiden University, 1994.
- (10) Grifo, F.; Rosenthal, J. *Biodiversity and human health*; Island Press: Washington D. C., 1997.
- (11) Dall'agnol, L. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 1997.
- (12) Fortunato, R. H. *Darwiniana* **1986**, *27*, 527-557.
- (13) Cronquist, A. *The evolution and classification of flowering plants*; 2nd ed.; The New York Botanical Garden: New York, USA, 1988.
- (14) Vaz, A. M. S. d. F. *Pesquisas Botânicas* **1993**, *44*, 95-113.
- (15) Gottlieb, O. R.; Laux, D. O.; Stefani, G. M. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1081-1084.
- (16) Silva, K. L. d.; Cechinel-Filho, V. *Química Nova* **2002**, *25*, 449-454.
- (17) Iribarren, A. M.; Pomilio, A. B. *Journal of Natural Products* **1983**, *46*, 752-753.
- (18) Iribarren, A. M.; Pomilio, A. B. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 360-361.
- (19) Iribarren, A. M.; Pomilio, A. B. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 857-858.
- (20) Chien-Chin, C.; Pan-Yuh, C.; Hong-Yen, H. B. *Journal of Natural Products* **1985**, *48*, 933.
- (21) Silva, K. L. d.; Biavatti, M. W.; Leite, S. N.; Yunes, R. A.; Monache, F. D.; Cechinel-Filho, V. Z. *Naturforsch* **2000**, *55c*, 478-480.
- (22) Sousa, E.; Szpogancz, B.; Pizzolatti, M. G. In *VI Encontro de Química da Região Sul da Sociedade Brasileira de Química* Maringá, Brasil, 1998.
- (23) Silva, F. R. M. B.; Szpogancz, B.; Pizzolatti, M. G.; Willrich, M. A. V.; Sousa, E. d. *Journal Ethnopharmacology* **2002**, *83*, 33-37.
- (24) Viana, E. P.; Santa-Rosa, R. S.; Almeida, S. S. M. S.; Santos, L. S. *Fitoterapia* **1999**, *70*, 111-112.
- (25) Viana, E. P.; Santa-Rosa, R. S.; Almeida, S. S. M. S.; Santos, L. S. In *Resumos da 23ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química* Caxambu, Brasil, 2000.
- (26) Vijayakumari, K.; Siddhuraju, P.; Janardhanan, K. *Plant Foods for Human Nutrition* **1993**, *44*, 291-298.
- (27) Kittakoop, P.; Kirtikara, K.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 349-352.
- (28) Achembach, H.; Stöcker, M.; Constenla, M. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1835-1841.
- (29) Gonzales-Mujica, F.; Motta, N.; Perdomo, E.; Mendez, J.; Hasegawa, J. *Revista Latinoamericana de Química* **2000**, *28*, 127.
- (30) Meyre-Silva, C.; Yunes, R. A.; Monache, F. D.; Santos, A. R. S.; Schmeling, L. O.; Gadotti, F. L.; Cechinel-Filho, V. Z. *Naturforsch* **2001**, *56c*, 939-942.
- (31) Coelho, C. B. B.; Silva, M. R. d. *Phytochemical analysis* **2000**, *11*, 295-300.
- (32) Rajaram, N.; Janardhanan, K. *J. Sci. Food Agric.* **1991**, *55*, 423-431.
- (33) Yadava, R. N.; Tripathi, P. *Fitoterapia* **2000**, *71*, 88-90.
- (34) Vijayakumari, K.; Siddhuraju, P.; Janardhanan, K. *J. Sci. Agric.* **1997**, *7*, 279.
- (35) Yuch-Hsiung, K.; Ming-Hsi, Y.; Shou-Ling, H. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2529-2530.
- (36) Bhartiya, H. P.; Dubey, P.; Katiyar, S. B.; Gupta, C. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 689.
- (37) Bhartiya, H. P.; Gupta, P. C. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2051.
- (38) Prabhakar, P.; Gandhidasan, R.; Nanduri, S. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 817-818.
- (39) Anjaneyulu, A. S. R.; Reddy, A. V. R.; Reddy, D. S. K. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 4245-4252.
- (40) Rabate, J. J. *Pharm. Chim.* **1938**, *28*, 435.
- (41) Maillard, M. P.; Recio-Iglesias, M. C.; Saadou, M.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K. *Helvetica Chimica Acta* **1991**, *74*, 791-799.

\* Referências de acordo com as normas internacionais de referênciação (Journal of Organic Chemistry).

- (42) Cechinel-Filho, V.; Breviglieri, E.; Willain-Filho, A.; Santos, R. S. *Revista Brasileira de Farmácia* **1995**, *76*, 115-117.
- (43) Braca, A.; DeTommasi, N.; Bari, L. D.; Pizza, C.; Politi, M.; Morelli, I. *Journal of Natural Products* **2001**, *64*, 892-895.
- (44) Mohan, V. R.; Janardhanan, K. *Advances in Plant Sciences* **1995**, *8*, 219-223.
- (45) Subramanian, S. S.; Nair, A. G. R. *J. Chem.* **1963**, *1*, 450.
- (46) Row, L.; Ramachandra, L.; Viswanadham, N. *Proc. Indian. Acad. Sci.* **1954**, *39*, 240.
- (47) Okwute, S. K.; Ndukwe, G. I.; Watanabe, K.; Ohno, N. *Journal of Natural Products* **1986**, *44*, 716-717.
- (48) Iribarren, A. M.; Pomilio, A. B. *Asociacion Quimica Argentina* **1989**, *77*, 461.
- (49) Sultana, S.; Ilyas, M.; Mohammed, K.; Shaida, W. A. *J. Indian. Chem. Soc.* **1985**, *8*, 337.
- (50) Gupta, A. K.; Vidyapati, T. J.; Chauhan, J. S. *Planta Medica* **1980**, *38*, 174-176.
- (51) Rahman, W.; Begun, S. J. *Naturwissenschaften* **1966**, *53*, 385.
- (52) Julian, C. *Rev. Med. Pharm. Chem. Phys.* **1929**, *2*, 1.
- (53) Russo, E. M. K.; Reichelt, A. A. J.; Sá, J. R. d.; Furlanetto, R. P.; Moisés, R. C.; Kasamatsu, T. S.; Chacra, A. R. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1990**, *23*, 11.
- (54) Pepato, M. T.; Keller, E. H.; Baviera, A. M.; Silva, M. P. M.; Vendramini, R. C.; Brunetti, I. L. In *XIII Reunião Anual da FSBE Caxambú, Brasil*, 1998.
- (55) Pepato, M. T.; Keller, E. H.; Baviera, A. M.; Kettelhut, I. C.; Vendramini, R. C.; Brunetti, I. L. *Journal Ethnopharmacology* **2002**, *81*, 191-197.
- (56) Volpato, G. T.; Damasceno, D. C.; Calderon, I. M. P.; Rudge, M. V. C. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **1999**, *2*, 49-55.
- (57) Damasceno, D. C.; Volpato, G. T.; Sartori, T. C. F.; Rodrigues, P. F.; Perin, E. A.; Calderon, I. M. P.; Rudge, M. V. C. In *XVI Latinoamerican Congress of Pharmacology Águas de Lindóia, Brasil*, 2000.
- (58) Lemus, I.; Garcia, E.; Knop, G. *Phytother. Res.* **1999**, *13*, 91-94.
- (59) Almeida, E. R.; Xavier, H.; Guedes, M. C. In *III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais Campinas, Brasil*, 1997.
- (60) Wazlawik, E.; Silva, M. A.; Peters, R. R.; Simões, C. M. O.; Vale, R. M. E. d. In *IX Reunião Anual da FSBE Caxambú, Brasil*, 1994.
- (61) Anjos, F. B. R.; Canto, A. S. J.; Leônico, M. P.; Santos, R. V. H. In *IX Reunião da FSBE Caxambú, Brasil*, 1994.
- (62) Gonzalez-Mujica, F.; Motta, N.; Becerra, A. *Phytotherapy Research* **1998**, *12*, 291.
- (63) Savi, A. O. S.; Breviglieri, E.; Bella-Cruz, A.; Yunes, R. A.; Cechinel-Filho, V. *Revista de Biologia Tropical* **1997**, *44-45*, 601-603.
- (64) Souza, R. S. S.; Santos, D. R.; Bella-Cruz, R. C. In *VI Seminário Integrado de Iniciação Científica Camboriú, Brasil*, 2000.
- (65) Willain-Filho, A.; Breviglieri, E.; Cechinel-Filho, V.; Santos, R. S. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 823-827.
- (66) Carvalho, J. C. T.; Santos, L. S.; Viana, E. P.; Almeida, S. S. M. S.; Marconato, E.; Rodrigues, M.; Ferreira, L. R. *Pharmaceutical Biology* **1999**, *37*, 281-284.
- (67) Asuzu, I. U.; Onu, U. O. *Fitoterapia* **1994**, *65*, 291-297.
- (68) Panda, S.; Kar, A. *Journal of Ethnopharmacology* **1999**, *67*, 233-239.
- (69) Akhtar, A. H.; Ahmad, K. U. *Journal of Ethnopharmacology* **1995**, *46*, 1-6.
- (70) Menezes, P. R.; Contin, A.; Schwarz, E. A.; Santos, C. A. M. In *XVII Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais do Brasil Cuiabá, Brasil*, 2002.
- (71) Robbers, J.; Speedie, M. K.; Tyler, V. E. *Farmacognosia e farmacobioteecnologia*; 1 ed.; Editorial Premier: São paulo, Brasil, 1997.
- (72) Pietta, P. G. *Journal of Natural Products* **2000**, *63*, 1035-1042.
- (73) Weisburger, J. H. *Food and Chemical Toxicology* **1999**, *37*, 943-948.
- (74) Wickens, A. P. *Respiration Physiology* **2001**, *128*, 379-391.
- (75) Rao, G. S. R.; Gerhart, M. A.; Lee, R. T.; Mitscher, L. A.; Drake, S. *Journal of Natural Products* **1982**, *45*, 646-648.
- (76) Nagem, T. J.; Pereira, W. L.; Oliveira, T. T.; Pinto, S. S.; Oliveira, M. G. A.; Stringheta, P. C. *Revista Brasileira de Farmácia* **1999**, *80*, 25-28.
- (77) Hernández, N. E.; Tereschuk, M. L.; Abdala, L. R. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, *73*, 317-322.
- (78) Tarus, P. K.; Machocho, A. K.; Lang'at-Thoruwa, C. C.; Chhabra, S. C. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 375-379.

- (79) Ogundaini, A.; Farah, M.; Perera, P.; elsson, G.; Bohlin, L. *Journal of Natural Products* **1995**, *59*, 587-590.
- (80) Wilhelm-Filho, D.; Silva, E. L. d.; Boveris, A. In *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*; Yunes, R. A., Calixto, J. B., Eds.; Argos: Chapecó, Brasil, 2001; Vol. 523.
- (81) Larson, R. A. *Phytochemistry* **1998**, *27*, 969-978.
- (82) Torel, J.; Cillard, J.; Cillard, P. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 383-385.
- (83) Paré, P. W. In *2000 years of natural products research: past, present and future*; Luijendijk, T. J. C., Ed.; Phytoconsult: Leiden, Netherlands, 2000, p 245.
- (84) Mann, J. *Secondary metabolism*; 2nd ed.; Oxford University Press: New York, USA, 1995.
- (85) Dewick, P. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*; John Wiley & Sons: West Sussex, England, 1997.
- (86) Corrêa, J. B. C., Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos.
- (87) McMury, J. *Química orgânica*; LTC: Rio de Janeiro, Brasil, 1997; Vol. 2.
- (88) Rover-Júnior, L.; Höhr, N. F.; Velásco, A. P.; Kubota, L. T. *Química Nova* **2001**, *24*, 112-119.
- (89) Cotran, R. S.; Kumar, V.; Robbins, S. L. *Robbins - Pathologic basis of disease*; W. B. Saunders Co.: Philadelphia, 1994.
- (90) Pryor, W. A. *Introdução ao estudo dos radicais livres*; Edgard Blücher: São Paulo, 1970.
- (91) Osawa, T. *Cosmetics & Toiletries (ed. português)* **1995**, *7*, 38-43.
- (92) Puppo, A. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 85-88.
- (93) Matos, F. J. A. *Introdução a fitoquímica experimental*; Ed. UFC: Fortaleza, Brasil, 1988.
- (94) Costa, A. F. *Farmacognosia*; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, Portugal, 1970; Vol. 3.
- (95) Zuanazzi, J. A. S. In *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; 2 ed.; Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R., Eds.; Ed. UFRGS Ed. EFSC: Porto Alegre, Brasil; Florianópolis, Brasil, 2000, p 821.
- (96) Wagner, H.; Bladt, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*; 2nd ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1996.
- (97) Okubaru, F.; Jannuzzi, L.; Humberto, R. In *Gazeta do Povo* Curitiba, Brasil, 2002.
- (98) Suisse, C. F. *Pharmacopoea Helvetica*; 7 ed. ed.; Departement Fédéral de l'Intérieur: Berne, Switzerland, 1995.
- (99) Wettasinghe, M.; Shahidi, F. *Food Chemistry* **1999**, *67*, 399-414.
- (100) Cziner, E.; Hagymási, K.; Blázovics, A.; Kéry, Á.; Szöke, É.; Lemberkovics, É. *Journal Ethnopharmacology* **2000**, *73*, 437-443.
- (101) Fejes, S.; Blázovics, A.; Lugasic, A.; Lemberkovics, E.; Petria, G.; Kéry, A. *Journal Ethnopharmacology* **2000**, *69*, 259-265.
- (102) Conforti, F.; Statti, G. A.; Tundis, R.; Menichini, F.; Houghton, P. *Fitoterapia* **2002**, *73*, 479-483.
- (103) Mensor, L. L.; Reis, A. S.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Coube, C. S.; Santos, T. C. *Phytotherapy Research* **2001**, *15*, 127-130.
- (104) Beltrame, F. L.; Sartoretto, J. L.; Bazotte, R. B.; Cuman, R. N.; Cortez, D. A. G.; Fernandes, L. C.; Tchaikovski, O. *Química Nova* **2001**, *24*, 783-785.
- (105) Williams, D. H.; Fleming, I. *Spectroscopic methods in organic chemistry*; 5<sup>th</sup> ed.; McGraw-Hill: London, 1997.
- (106) Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. *The systematic identification of flavonoids*; Springer-Verlag: New York, 1970.
- (107) Siddhuraju, P.; Mohan, P. S.; Becker, K. *Food Chemistry* **2002**, *79*, 61-67.
- (108) Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. *Food Chemistry* **1999**, *64*, 555-559.
- (109) Magnani, L.; Gaydou, E. M.; Hubaud, J. C. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *411*, 209-216.
- (110) Demirezer, L. Ö.; Kuruüzüm-Uz, A.; Bergere, I.; Schiewe, H. J.; Zecek, A. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 1213-2117.
- (111) Basile, A.; Sorbo, S.; Giordano, S.; Ricciardi, L.; Ferrara, S.; Montesano, D.; Cobianchi, R. C.; Vuotto, M. L.; Ferrara, L. *Fitoterapia* **2000**, *71*, S110-S116.
- (112) Deng, Y.; Lee, J. P.; Tianasoa-Ramamonjy, M.; Snyder, J. K.; Etages, S. A. D.; Kanada, D.; Snyder, M. P.; Turner, C. J. *Journal Natural Products* **2000**, *63*, 1082-1089.
- (113) Sloneker, J. H. *Meth. Carbohydr. Chem.* **1972**, *6*, 20-24.
- (114) Engler, A. *Syllabus der pflanzenfamilien*; 12 ed.; Borntraeger: Berlin, 1964; Vol. 2.
- (115) Delgobo, C. L. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 1993.
- (116) Lima, N. N.; Wilhelm, H. M.; Reicher, F.; Ganter, J. L. M. S.; Sierakowski, M. R. In *V International Macromolecular Colloquium* Gramado, Brasil, 1992, p 168.
- (117) Lima, N. N. Dissertação de mestrado. Dpto de Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 1993.

- (118) Busato, A. P. Dissertação de mestrado. Dpto de Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 1999.
- (119) Perissutti, G. E. Dissertação de mestrado. Dpto de Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 1999.
- (120) Doroso, N. Dissertação de mestrado. Dpto de Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 1981.
- (121) Woranovicz, S. M. Dissertação de mestrado. Dpto de Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 1995.
- (122) Haworth, W. N. *J. Chem. Soc.* **1915**, 107, 8-16.
- (123) Woranovicz, S. M.; Pinto, B. M.; Gorin, P. A. J.; Iacomini, M. *Phytochemistry* **1999**, 51, 395-402.
- (124) Adams, G. A. *Methods in Carbohydrate Chemistry* **1965**, 5, 269-276.
- (125) Wolfrom, M. L.; Thompson, A. *Meth. Carbohydr. Chem.* **1963**, 2, 65-68.
- (126) Wolfrom, M. L. *Meth. Carbohydr. Chem.* **1963**, 2.
- (127) Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. *Analytical Biochemistry* **1999**, 269, 337-341.
- (128) Barry, A. L.; Coyle, M. B.; Thornsberry, C.; Gerlach, E. H.; Wawkinson, R. W. *Journal of Clinical Microbiology* **1979**, 10, 885-889.
- (129) Trabulsi, L. R. *Microbiologia*; 2ed ed.; Atheneu: São Paulo, 1998.
- (130) Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. *Manual of clinical microbiology*; 7<sup>th</sup> ed.; ASM Press, 1999.
- (131) Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Kolak, U.; Bozok-Johansson, C.; Celik, C.; Voelter, W. *Planta Medica* **2000**, 66, 458-462.
- (132) Amarego, W. L. F.; Perrinn, D. D. *Purification of laboratory chemicals*; 4 ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 1996.